

VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

Е.М. Саминский

ТРАНСЛЯЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОДА НА РИБОСОМАХ

Е.М. Саминский

ТРАНСЛЯЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОДА НА РИБОСОМАХ

Саминский Е.М. **Трансляция генетического кода на рибосомах.** СПб.: Изд-во СПбГТУ, 2000. 87 с.

Представлен курс лекций, прочитанных на кафедре биофизики физико-механического факультета СПбГТУ в 1997–1999 гг. Он включает в себя краткую историю расшифровки генетического кода; рассмотрены также структуры и функции рибосом, рибосомных и транспортных РНК, процессы инициации, элонгации и терминации трансляции кода на рибосомах, а также некоторые вопросы точности трансляции и случаи отклонения от стандартных правил прочтения генетического кода.

Предназначен для студентов старших курсов и аспирантов биологических и биофизических специальностей высших учебных заведений.

Работа поддержана Федеральной целевой программой “Интеграция”,
Государственный контракт № А0137/2000.

Развитие и поддержка совместного учебно-научного центра
“Молекулярно-биологические проблемы современной медицины”.

Автор выражает благодарность Б.С. Миценко за большую помощь в подготовке рукописи к публикации.

1. ВВЕДЕНИЕ И ИСТОРИЯ

Механизм биосинтеза белка некоторые авторы называли “наиболее совершенным механизмом, когда-либо созданным природой”. Едва ли это правильно, поскольку мы многих механизмов еще и не знаем. Тем не менее, совершенство и изящество, с которым природа решила сложнейшую задачу — трансляцию генетического кода — несомненно. Тем удивительнее, что мы в этом механизме более или менее разобрались, хотя и не полностью. По мнению авторов учебников по молекулярной биологии, период первоначального бурного и успешного наступления — 1952–1972 гг. Еще в 30-х – 40-х гг. шли споры о том, какова химическая структура белка, и считается, что окончательная победа представления о том, что белок — это полипептидная цепочка аминокислот, расположенных в строго заданной последовательности, имела место в начале 50-х гг., когда Сэнгер расшифровал первый белок — гормон инсулин (нобелевская премия 1958 г.).

Начиная с этого времени с помощью “удивительных по глубине, экспериментальному совершенству и изяществу работ” ([Шалпиль, Энни, 1977], стр. 6) были раскрыты основные черты реакции биосинтеза белка в живой клетке. Красота и остроумие многих экспериментов производят сильнейшее впечатление и внушают уважение к человеческому интеллекту, исправляя таким образом впечатление о нем, получаемые в будничной жизни. Хотелось бы поэтому рассказывать не только о научных фактах, но и о том, как эти факты были добыты (хотя бы кратко), но в большинстве случаев на это не будет времени. Постарайтесь, пользуясь своим багажом знаний, сами понять, как можно было поставить эксперименты в том или ином интересном случае.

Биосинтез белка — не только один из самых сложных, но и один из самых важных механизмов в живой природе. Ведь белки — это, можно сказать, носители жизни. Они составляют порядка 50 % сухой массы, или 15–18 % живой массы клетки и выполняют самые разные функции: катализаторов, переносчиков, структурную, механо-химическую, иммунную и многие другие (например, существуют белки, предотвращающие замерзание цитоплазмы, формирующие третичную структуру других белков, и т.д.).

Прогресс в молекулярной биологии происходит удивительно быстро, а приводимые конкретные данные часто устаревают в течение одного-двух лет. Я рассчитываю рассказать только о некоторых важных и интересных проблемах с тем, чтобы вы получили представление о состоянии дел в данной области и могли дальше самостоятельно ориентироваться и, по мере необходимости, пополнить и углублять знания, пользуясь обзорами и монографиями, которые все время печатаются, а еще более детально — оригинальными статьями, откуда можно взять дальнейшие ссылки. Таким образом, я не ставлю задачу — дать непременно самые последние сведения. Кроме того, в рамках данного достаточно краткого курса я не могу слишком углубляться в детали, поскольку тогда получится совершенно необозримое количество сведений. Я рассчитываю на то, что вы уже имеете базовые знания, или получите их из других курсов.

1.1 СТРУКТУРА БЕЛКА

Теперь очень кратко о структуре белка и о том, какую задачу должен выполнять механизм биосинтеза. Белок как вещество, в соответствии с его ролью, может образовывать твердое или эластичное тело, гель, или истинный раствор в воде. Тем не менее основа белка — это

всегда неразветвленная цепочка аминокислот, соединенных “голова к хвосту”, т. е. карбоксил одной аминокислоты соединен с аминогруппой соседней. Связь называется пептидной, а вся цепочка — полипептидом.

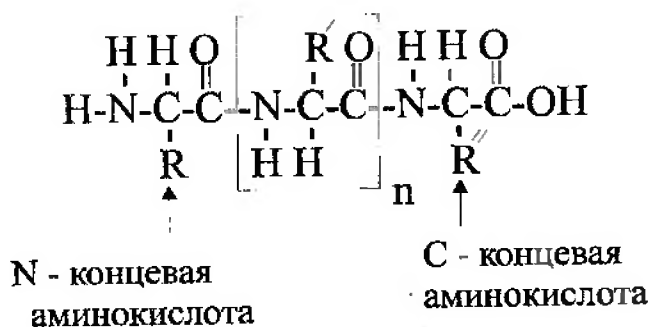


Рис. 1.1 Полипептидная цепочка

Соединение происходит с выделением молекулы воды (конденсация) и с затратой сравнительно небольшой свободной энергии, около 0,5 ккал/моль. Цепочка в природных полипептидах может быть длиной от единиц до тысяч звеньев (Рис. 1.1). Но к белкам условно относят только молекулы, цепочки которых имеют не менее двух десятков звеньев. Они состоят из аминокислот 20 различных видов, и притом только левых (хотя в природе их встречается гораздо больше, и в том числе и правых) (Рис. 1.2). Почему только 20 и только левых? Неизвестно. Можно предполагать, что это количество отобрано в ходе эволюции, как необходимый и достаточный набор, а “левизна”, возможно, служит указанием на общность происхождения от общего “прапредка”.

Первичная структура определяет все свойства белка, и, прежде всего, вторичную структуру (альфа-спирали, и бета-слои), а затем — третичную и четвертичную структуры и все физико-химические и биологические свойства. Задача механизма биосинтеза — образовать первичную структуру. Но как потом правильным образом свернуть цепь в пространстве? Я помню, какую сенсацию произвели опыты Анфинсена (нобелевская премия 1972 г.), показавшего, что полностью развернутая цепь рибонуклеазы с разорванными дисульфидными сшивками снова сворачивается при надлежащем отжиге в нативную структуру, обладающую ферментативной активностью. Это значит, что уже в первичной структуре заложены необходимые условия для спонтанного правильного свертывания. То есть нативная конформация имеет наименьшую из возможных свободную энергию. Правда, рибонуклеаза — небольшой белок (124 аминокислоты), и в дальнейшем оказалось, что большинство белков не удается так запросто ренатурировать. Вопрос об образовании структуры пока детально не выяснен. Возможно, что какое-то структурирование идет параллельно удлинению цепочки во время синтеза. Кроме того, сейчас найдены и исследуются специальные белки, так называемые шапероны (chaperons), которые катализируют правильное свертывание вновь синтезируемых белков (и, возможно, РНК). Об этом мы еще поговорим [см. Johnson, Craig 1977]. Во всяком случае, считается несомненным, что нативное конформационное состояние белковой молекулы — стабильное, обладающее наименьшей свободной энергией, или метастабильное, с энергией близкой к наименьшей.

Легко сообразить, что цепочка из 20 видов аминокислот длиной 300 звеньев может иметь 20 в 300 степени вариантов, из которых природа в процессе эволюции отобрала только незначительную часть (порядка 100 тысяч) вариантов, имеющих нужные свойства.

Очевидно, что крайне малая доля из всех возможных конформаций будет удовлетворять этому условию. Они и были отобраны эволюцией. Не случайно сейчас, когда удалось выяснить

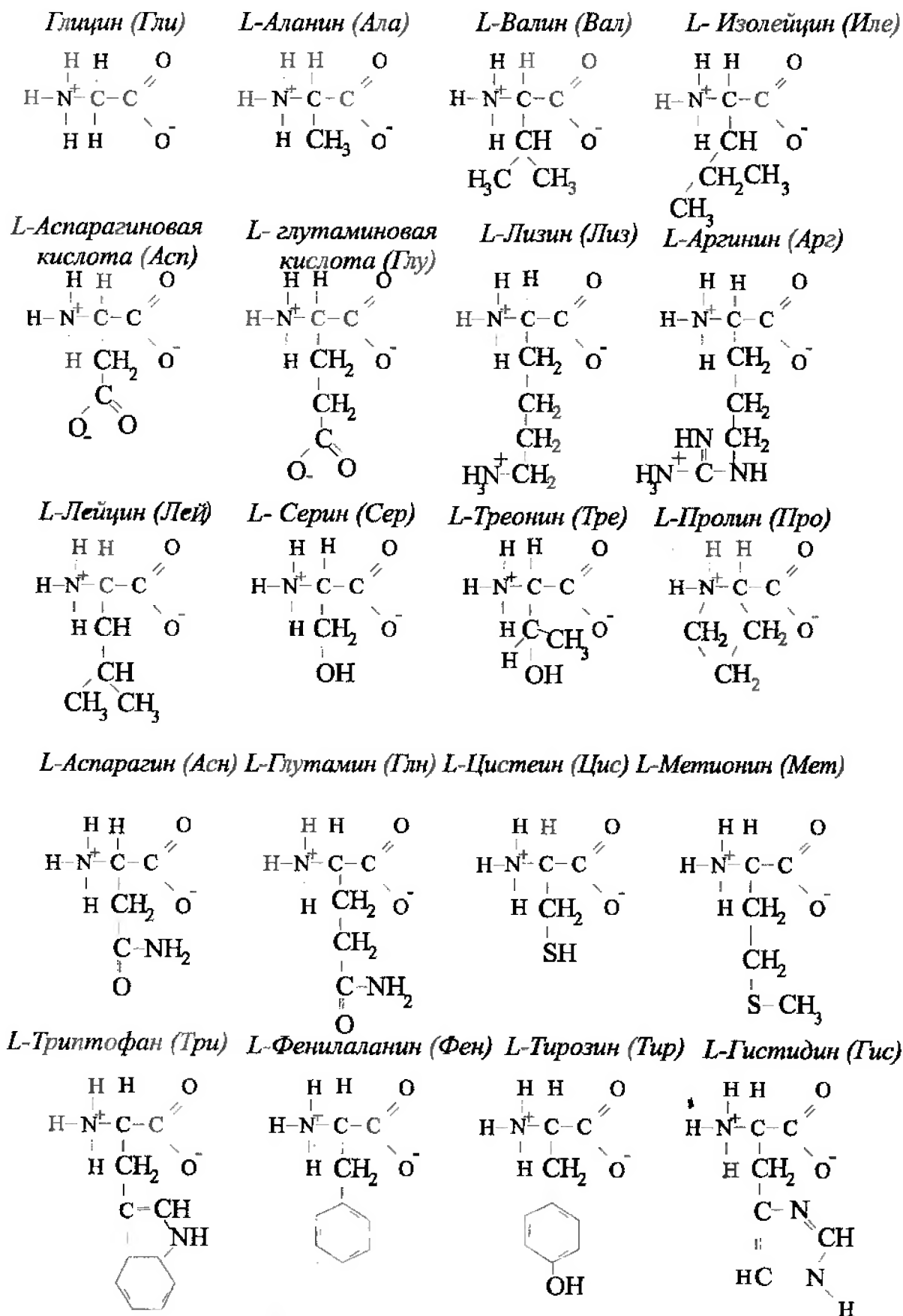


Рис. 1.2 Аминокислоты, входящие в состав белков

Известно около 200 природных аминокислот, но из них только 20 входят в состав белков всех организмов, их структура приведена на рисунке.

пространственную структуру многих белковых молекул, стало видно, что в ней встречаются нередко сходные так называемые “структурные мотивы”, т. е. участки, уложенные сходным образом, хотя иногда и имеющие разную первичную структуру.

К разделу “биосинтез белка” можно отнести и так называемый “процессинг”, или “созревание” (“maturation”) белковой молекулы, то есть ее модификацию после синтеза: модификации С- и N-концов, иногда — боковых групп аминокислот в составе цепи, пришивка олигосахаридов, фосфатов, (гликозилирование, фосфорилирование), липидов, присоединение простетических групп, и т.д. Для этого существуют специальные ферменты. Но это отдельная область, и мы здесь ее касаться не будем.

1.2 ТРАНСЛЯЦИЯ

Мне не нужно объяснять вам подробно, что такое общий механизм трансляции. Это перевод текста, заданного генетическим кодом, т.е. линейной последовательностью 4-х сортов нуклеотидов в линейную последовательность из 20 сортов аминокислот. То, что мы знаем об этом процессе — есть одно из главных достижений современной биологии. Я хочу начать с рассказа о логике процесса, приведшего к этим успехам. В значительной мере роль сыграло появление адекватных экспериментальных методов. К ним относятся (навскидку):

применение радиоактивно меченых изотопов, прежде всего, фосфора-32 (теперь и-33), водорода-3 (трития), серы-35 и углерода-14, и, в меньшей степени, стабильных изотопов азота, углерода, водорода, фосфора и др.;

изобретение ультрацентрифуги;

открытие и разработка системы внеклеточного синтеза белка;

теперь еще и современные методы генной инженерии;

и, конечно, современные методы анализа: УФ, ИК, ЯМР и масс-спектрометрия, электронная микроскопия в разных вариантах, хроматография, электрофорез, рентгеноструктурный анализ и т.д.

К началу и в самом начале периода быстрых успехов было уже известно, что:

1. ДНК — носитель генетической информации, поскольку ДНК существует во всех клетках, способна переносить генетическую информацию от одной бактериальной клетки к другой (Эвери, 1944 г.), и имеет структуру двойной спирали из двух цепочек нуклеозидов четырех сортов. При этом на цепочках друг против друга расположены нуклеозиды, основания которых комплементарны друг другу (Крик и Уотсон, 1953, нобелевская премия 1962 г.). Такая структура, очевидно, способна переносить информацию.

2. Белки построены из полипептидных цепей с определенными последовательностями из 20 видов аминокислот.

3. К середине 50-х гг. усилиями многих ученых была уже разработана так называемая “бесклеточная система” (“cell-free system”) биосинтеза. Если разрушить каким-либо образом клеточные стенки и осадить в центрифуге обломки стенок и форменные элементы, то, добавив в надосадочную жидкость радиоактивно меченые аминокислоты, можно было наблюдать их частичное включение в кислотонерастворимую фракцию, т. е., предположительно, в белки. Обычно добавляют трихлоруксусную кислоту до концентрации 5 %, хорошо осаждающую почти все белки. Постепенно бесклеточную систему усовершенствовали, и именно с ее помощью сделаны были важнейшие открытия. О ней мы тоже еще поговорим подробнее.

Применимость системы к исследованию реальных событий в интактной клетке была доказана, когда в ней удалось синтезировать белковые молекулы *de novo* (Швит с сотр. — гемоглобин в системе из ретикулоцитов (1960), Новелли с сотр. — фермент бета-галактозидазу в лизате из *E. coli* (1961)). Это далось непросто; сначала показали, что аминокислоты,

действительно, соединяются пептидной связью, затем удалось идентифицировать короткие олигопептиды, такие же, как в составе белка, затем долго шли споры о том, действительно ли строятся белки *de novo*, или активируются уже предсуществующие белки.

4. Были открыты микросомы (рибосомы). Многочисленные эксперименты, как с клетками, так и с бесклеточными системами, показали, что радиоактивно меченые аминокислоты, включаясь в белок, сначала обнаруживались в крупных рибонуклеопротеиновых частицах и лишь позднее переходили в раствор. Разрушив клеточные стенки, эти частицы можно седиментировать в ультрацентрифуге (1–2 часа при 40000 об/мин., 70–80 единиц Сведберга). Их называли сначала микросомами, а позднее - рибосомами. Они содержат более 80 % всей клеточной РНК.

5. Была осознана проблема генетического кода. Ее четко сформулировал Гамов в 1954 г., хотя осознали ее несколько раньше. Речь шла о том, каким образом последовательность из 4 видов оснований ДНК определяет последовательность 20 аминокислот в полипептиде. Тогда уже были рассмотрены возможные варианты такого кода, в частности, ясно было, что двухбуквенный код не годится (поскольку в нем может быть всего 16 вариантов “слов”), а трехбуквенный — вполне возможен (64 “слова” с избытком достаточно для кодирования 20 аминокислот). Интересно, что Гамов — не биолог, а известный физик-теоретик. Физики, вообще, сыграли выдающуюся роль в зарождении молекулярной биологии. В то время еще не была известна первичная структура НИ ОДНОЙ ДНК или РНК.

6. Была сформулирована “адапторная” гипотеза и открыта тРНК, т.е. предполагаемый адаптор. Еще в самом начале 50-х, когда осознали проблему генетического кодирования, была высказана идея о том, что должны существовать некие адапторы, посредники между ДНК и полипептидами, поскольку между ними не усматривалось никакого прямого стерического соответствия. Гипотеза о том, что олигонуклеотиды могут быть такими адапторами, была высказана тем же Ф.Криком, а в 1957 г. Хогланд обнаружил в клетках РНК небольшой молекулярной массы, с константой седиментации 4S (молекулярная масса около 25 кДа), которая связывала довольно лабильной (не пептидной!) связью поступающие в клетку аминокислоты, которые затем переносились в белки. Эта РНК получила сначала название sРНК (soluble RNA), а позднее - тРНК (transfer, транспортная РНК). Быстро было доказано, что это и есть искомый адаптор.

7. Теперь — об открытии мРНК (“матричной РНК”). Эксперименты конца 50-х гг. с безъядерными клетками и с бесклеточной системой показали, что синтез белка возможен, даже если ДНК в системе нет. В частности, в бесклеточной системе ДНК можно разрушить специальным ферментом — ДНКазой. А присутствие большого количества РНК, наоборот, обязательно. РНК, как известно, может быть таким же носителем информации, как и ДНК. Значит, переносчиком информации от ДНК, ее носителя, к месту трансляции должна быть РНК. Подозревали рибосомную РНК (рРНК). Но многие факты говорили о том, что рРНК не подходит для этой роли. В частности, слишком велика ее стабильность, а нуклеотидный состав, как оказалось, сильно отличается от состава ДНК. Жакоб и Моно высказали гипотезу о том, что существует специальная РНК, названная информационной, которая комплементарна ДНК и переносит информацию от ДНК к рибосомам. Такая РНК не должна быть стабильной, она должна быстро синтезироваться и распадаться. Импульсная метка клеток радиоактивным фосфором помогла обнаружить такую быстро метящуюся и быстро распадающуюся РНК (Волкин и Астрахан, 1956–57 годы).

8. К концу 50-х гг. накопился опыт по химическому синтезу коротких олигонуклеотидов (двоек, троек, четверок), а также был открыт фермент полинуклеотидфосфорилаза, синтезирующий длинные цепочки сополимеров, исходя из рибонуклеозид-5'-дифосфатов (чередование — статистическое).

Теперь все было готово для последующего успеха, а именно, для расшифровки генетического кода.

1.3 РАСШИФРОВКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОДА

Еще в 1958 г. один из нобелевских лауреатов (Тейтем) в нобелевской лекции выразил надежду, что кто-нибудь из присутствующих, может быть, доживет до расшифровки генетического кода. Но это произошло всего несколько лет спустя! В 1961 г. в *Nature* появилась работа того же Ф.Крика с соавт. по мутациям бактериофага под действием красителя акридина. Это вещество так модифицирует нуклеотиды ДНК, что при репликации последней происходит либо делеция либо вставка нуклеотида, изменяющая фенотип. Подробное исследование кратных мутаций показало, что вторая вставка поблизости от первой не исправляет действие первой вставки, а третья — исправляет, восстанавливая дикий фенотип. То же справедливо и для делеций и истолковано как доказательство того, что код — триплетный, без “знаков препинания”, и поэтому делеция или вставка вызывают “сдвиг рамки считывания” (Рис. 1.3).

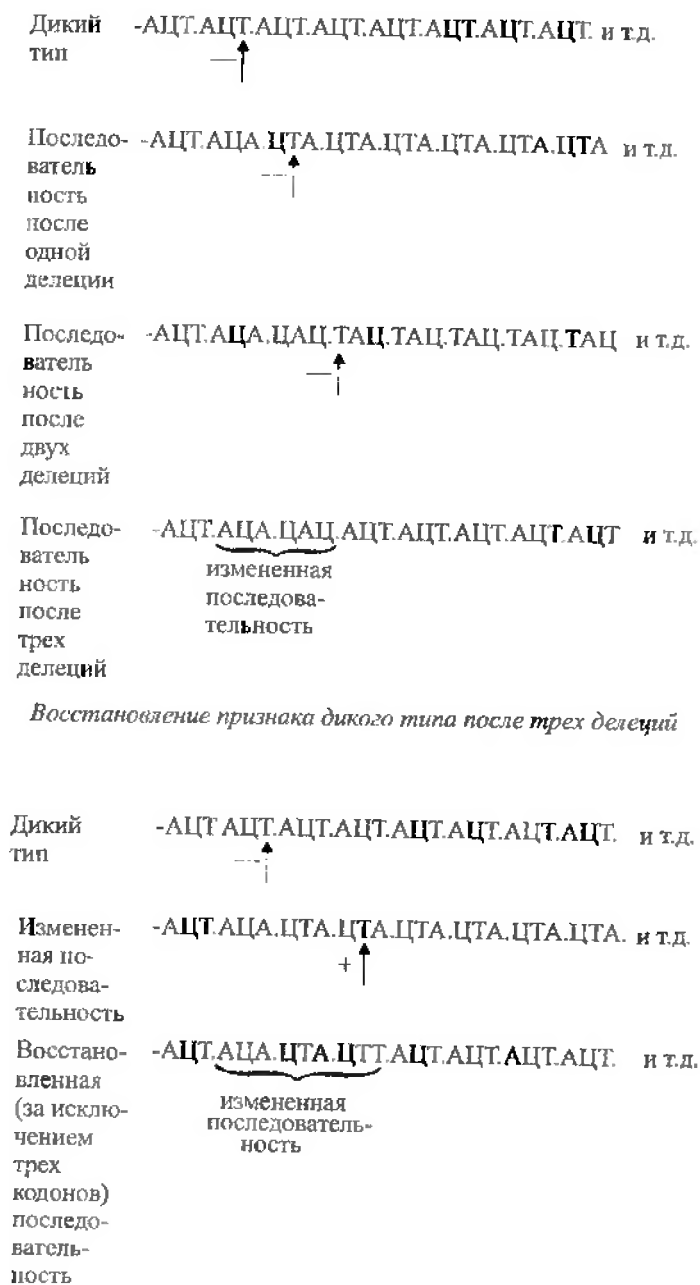


Рис. 1.3. Объяснение опытов Ф.Крика

В том же году появилась знаменитая работа Ниренберга и Маттеи, которые использовали для расшифровки кода бескеточную систему. Эти авторы добавили в бескеточную систему синтетическую полирибонуклеиновую кислоту в качестве мРНК, и стали искать полипептидные цепочки, которые будут синтезироваться на ней, как на мРНК, из радиоактивно меченых аминокислот. Прежде всего, естественно, использовали гомополимеры, которые, как я уже упоминал, умели в то время делать. То есть испытали поли (U), поли (A) и поли (C). Поли (G) оказалась непригодной из-за очень устойчивой вторичной структуры и агрегации в растворе. Это очень смелый опыт, и он, в принципе, не должен был получиться, поскольку мРНК, как мы теперь знаем, должна иметь специальные сигналы для начала цепи. Тем не менее, система сработала: по поли (U) синтезировался полифенилаланин. Так был открыт первый кодон, UUU — соответствовал фенилаланину. Позднее был обнаружен синтез полилизина по поли(A) и полипролина по поли (C). Далее работа продолжалась на сополимерных матрицах, хотя таким способом невозможно однозначно определить весь код.

В 1964 г. Ниренберг и Ледер нашли замечательно остроумный выход. Они отказались от наблюдения самого синтеза, а довольствовались тем, что определяли, какую аминоксил-тРНК узнает рибосома, если взять в качестве мРНК просто тринуклеотид определенного состава. Испытали все 64 возможных варианта. И код был расшифрован. Авторы применили очень мощную методику. Оказалось, что при фильтрации через нитроцеллюлозные мембранные фильтры рибосомы намертво адсорбируются на них, и если та или иная аминоксил-тРНК, радиоактивно меченная по аминокислоте, прилипает к рибосомам под влиянием тринуклеотида, это немедленно обнаруживается при помещении фильтра в счетчик. Эта методика применяется до сих пор.

Наконец, в 1967 г. замечательный химик Корана сумел синтезировать матричные полинуклеотиды, состоящие из повторяющихся одинаковых триплетов. Например, полимер (AAG)_n служил матрицей для полилизина (кодон AAG), полиаргинина (кодон AGA) и полиглутаминовой кислоты (кодон GAA). Эксперименты исправили некоторые ошибки в первоначальной кодовой таблице, и с тех пор генетический код считается расшифрованным (Рис. 1.4).

UUU } Phe F	UCU } Ser S	UAU } Tyr	UGU } Cys C
UUC }	UCC }	UAC }	UGC }
UUA } Leu L	UCA }	UAA ochre	UGA opal
UUG }	UCG }	UAG amber	UGG Trp W
CUU } Leu L	CCU } Pro P	CAU } His H	CGU } Arg R
CUC }	CCC }	CAC }	CGC }
CUA }	CCA }	CAA GLN Q	CGA }
CUG }	CCG }	CAG }	CGG }
AUU } Ile I	ACU } Thr T	AAU } Asn N	AGU } Ser S
AUC }	ACC }	AAC }	AGC }
AUA }	ACA }	AAA } Lys K	AGA } Arg R
AUG Met M	ACG }	AAG }	AGG }
GUU } Val V	GCU } Ala A	GAU } Asp D	GGU } Gly G
GUC }	GCC }	GAC }	GGC }
GUA }	GCA }	GAA } Glu E	GGA }
GUG }	GCG }	GAG }	GGG }
N+D=B		Q+E=Z	

Рис. 1.4 Генетический код и современные однобуквенные обозначения аминокислот

Код, действительно, оказался триплетным и без “запятых” (т. е. для правильного прочтения требуется жестко задать “рамку считывания” (“reading frame”). Он вырожденный, т. е. некоторым из аминокислот соответствует несколько кодонов:

Leu, Ser, Arg — по 6 кодонов;

Val, Pro, Thr, Ala, Gly — по 4 кодона;

Ile — три кодона;

Phe, Tyr, His, Gln, Asn, Glu, Asp, Cys, Lys — по 2 кодона;

Met, Trp — по одному кодону.

Три триплета не соответствуют никакой аминокислоте (“nonsense”, т. е. “бессмысленные” кодоны), и, как выяснилось позднее, служат сигналами окончания цепи (терминации). Соответственно, при заменах нуклеотидов в значащих кодонах, если эти замены приводят к бессмысленным кодонам, белок не синтезируется вообще (обрывы цепей).

Как определили бессмысленные кодоны в качестве терминирующих? Научились делать нонсенс-мутации. Показали, что в таких мутантах не делается соответствующий активный белок, но обнаруживается его N-концевой полипептид. Изучение генетики щелочной фосфатазы *E. coli* показало, что обнаруживаются нонсенс-мутации двух классов. Потом показали, что один из них имеет UAA (ochre), другой — UAG (amber) триплет в рамке считывания. На гене rII фага T4 это подтвердили и нашли еще один — UGA (opal). Когда стали сиквенировать фag MS2, оказалось, что эти кодоны служат и природными терминаторами.

За расшифровку генетического кода нобелевские премии получили в 1968 г. Ниренберг и Корана. Премию они получили вместе с Холли, который в 1965 г. расшифровал первичную структуру одной из транспортных РНК (аланиновую тРНК из *E. coli*).

Над кодовой таблицей очень много размышляли, ища в ней некие правила, согласно которым могла бы идти эволюция. Например, можно искать структурное соответствие между кодоном и соответствующей аминокислотой. Возможно также, что мало отличающиеся друг от друга кодоны (отличающиеся одним нуклеотидом) кодируют сходные по свойствам аминокислоты (гидрофобные, основные, кислые) так, чтобы ошибки трансляции приводили к наименьшим последствиям для функции белка. Но, по видимому, признанных успехов на этом пути не удалось добиться.

Бросается в глаза то обстоятельство, что в большом количестве случаев код, вообще, двухбуквенный, т. е. существенное значение имеют только первые два нуклеотида в кодоне. Имеется восемь “семейств” кодонов, в которых не существенен третий нуклеотид, семь в которых важно только, чтобы был пиримидин, пять — чтобы был пурин, и совсем мало уникальных кодонов. Возможно, что третий нуклеотид появился позднее первых двух в процессе эволюции.

В первые годы после расшифровки генетического кода поражала воображение его универсальность, он был одинаков всюду - от бактерии до человека: “что верно для *Escherichia coli*, то верно и для слона”... Но постепенно накапливались сведения об отклонениях - как в значении отдельных кодонов, так и в правилах линейного их прочтения. Некоторые авторы называют всю совокупность таких отклонений “перекодированием” (“recoding”). К ним относят изменения значения кодона, (“redefinition”), сдвиги рамок считывания (“frameshifting”), шунтирование (“bypassing”). Эти явления мы рассмотрим в конце курса.

1.4 АППАРАТ ТРАНСЛЯЦИИ

Аппарат трансляции включает в себя рибосомы, мРНК, тРНК и несколько ферментов и так называемых “белковых факторов трансляции”. Более изучена, естественно, трансляция прокариот; система эукариот, принципиально, та же самая, но более сложная, в ней участвует гораздо больше факторов.

1.4.1 ПРИГОТОВЛЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РИБОСОМ, БЕСКЛЕТОЧНАЯ СИСТЕМА.

Вскрыв клетки тем или иным образом и убрав обломки стенок и форменные элементы низкоскоростным центрифугированием, а низкомолекулярные продукты - диализом против подходящего буфера, получаем бесклеточную систему, синтезирующую в небольшом количестве белки из добавленных аминокислот (обычно радиоактивно меченных). Трансляция направляется эндогенной мРНК и продолжается несколько десятков минут. Количество вновь синтезированного белка — не более 1–2 % от общего количества белка в системе. Синтезируются большей частью неполные белки, полипептидные обрывки.

Система эта со временем усовершенствовалась. Постепенно выяснилось, какие факторы необходимы для работы системы. Это рибосомы, тРНК и мРНК. Далее, так называемые белковые факторы элонгации (EF-факторы). У прокариот их три: EFTu, EFTs и EFG. Далее, три фактора инициации (IF_{1,2} и 3) и три - терминации (release factors, RF_{1,2} и 3). Нужна определенная ионная сила (около 0,2 М), рН (7–8) и определенный ионный состав среды: присутствие ионов Mg^{2+} (3–10 mM), K^+ или NH_4^+ (но не Na^+ , который нейтрален, и не Li^+ , который даже ингибирует). Для работы факторов необходим GTP (порядка 0,1 mM). Образующийся GDP является очень мощным ингибитором, и в современных экспериментах всегда добавляют макроэргический донор фосфата, например, фосфоэнолпируват и пируваткиназу, которая переносит фосфат на GDP (и на другие нуклеозиддифосфаты), превращая его в трифосфат, так что концентрация GDP все время ничтожно мала. тРНК должна быть аминоацилирована соответствующими аминокислотами, или в системе должны присутствовать свободные аминокислоты, все необходимые аминоксил-тРНК синтетазы и АТФ для их работы. Освободившийся при аминоацилировании пирогосфат сразу же расщепляется присутствующей в смеси растворимых белков пирофосфатазой. Тогда тРНК аминоацилируется *in situ* и работает каталитически, оборачиваясь многократно. Наконец, для защиты SH-групп белков рибосом и факторов, добавляют SH-реагент — 2-меркаптоэтанол $HO-CH_2-CH_2-SH$ или дитиотреитол $SH-CHOH-CHOH-SH$.

Как видим, система довольно сложна. Начинаясь она просто с клеточного лизата, диализованного против буфера с аминокислотами, солями, макроэргами и меркаптоэтанолом. Низкоскоростное центрифугирование производилось обычно про 30 тыс.г, поэтому система называется S-30 — системой. Чтобы сделать ее зависимой от добавленной мРНК и от факторов трансляции, рибосомы седиментируют в ультрацентрифуге, обычно несколько часов при 100000g (система S-100). У прокариот этого достаточно для получения гомогенного по константам седиментации препарата. Но у эукариот рибосомы прикреплены к внутренним мембранам (эндоплазматическому ретикулуму; это хорошо видно в электронном микроскопе), и для освобождения от липидов необходима обработка мягким детергентом (дезоксихолатом). Затем рибосомы можно отмыть от факторов и прочих налипших белков, от эндогенных мРНК и тРНК и незаконченных (насcentных) полипептидов, седиментируя и вновь суспендируя их несколько раз в буферах при повышенной (до 1М) концентрации хлористого калия или аммония и пониженной концентрации ионов магния (1 mM и ниже). Если изучают свойства субчастиц, рибосому диссоциируют, суспендируя в буфере, содержащем пониженную (1–0,1mM) концентрацию Mg^{2+} , разделяют субчастицы дифференциальным ультрацентрифугированием или седиментацией через градиент плотности сахарозы. Надосадочную жидкость тоже разделяют на фракции разными способами, обычно хроматографией, выделяя стимулирующие факторы, и, наоборот, удаляя ингибирующие примеси, например, РНКазы и протеазы.

Иногда удобно использовать вместо экзогенной мРНК просто соответствующий ДНК-ген, который *in situ* транскрибируется, если в растворе (например, в нефракционированной надосадочной жидкости) присутствуют факторы транскрипции и все 4 рибонуклеозидтрифосфата. Для работы это очень выгодно, поскольку, по не вполне ясной пока причине, выход трансляции в такой системе сильно повышается, и транскрипцию ДНК не удастся заменить добавлением увеличенного количества мРНК.

Такие системы собирают из разных организмов, как про-, так и эукариот. В некоторых случаях — это трудная задача, например, если в соответствующих организмах или тканях много гидролитических ферментов. Последние, например, могут испортить рибосомы еще на стадии их выделения. Приходится прибегать к разным ухищрениям, ускорять процедуры, добавлять ингибиторы протеаз и РНКаз. Наоборот, в смеси растворимых белковых факторов из ретикулоцитов таких ферментов удивительно мало, и смесь растворимых ферментов из ретикулоцитов, где возможно, используют для составления бесклеточной системы, если надо, то даже с гетерологическими рибосомами и тРНК.

Чтобы система работала, необходимо поддерживать строго определенную оптимальную концентрацию ионов магния (где-то около 6 мМ). В последние годы показано, что лучше, когда часть ионов магния заменена органическими поликатионами спермина и спермидина [$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$]; такие условия как будто бы имеют место *in vivo*.

Конечно, работоспособность бесклеточной системы зависит от стабильности ее компонентов. О стабильности факторов трансляции мы будем говорить позднее. мРНК очень чувствительна к РНКазам, которых в клетках много и разных. Во время синтеза рибосома защищает от гидролиза довольно протяженный участок мРНК, но внерибосомные участки не защищены. Для минимизации концентрации РНКаз иногда используют мутантные клетки, лишенные некоторых РНКаз, не очень существенных для жизни клеток. Один из интересных мутантов подобного рода был найден в 60-е гг. Оказалось, что рибосомы *E. coli* В содержат довольно много пириимидиновой РНКазы, правда, в латентном состоянии. Но она активировалась при любом разрушении рибосом. Оказалось, что эта РНКаз в живых клетках не имеет никакого отношения к рибосомам, и налипает на последние при вскрытии клеток. В дальнейшем были найдены даже штаммы дикого типа (MRE-600), не содержащие этой РНКазы. Другой ограничитель — активность самих рибосом. В концентрированной взвеси (десятки мг/мл) рибосомы в оптимальных условиях сохраняют активность десятки часов (в некоторых случаях добавляют сахарозу или глицерин). Для длительного хранения можно быстро заморозить их в жидком азоте. Но дело в том, что уже в процессе выделения рибосомы сильно портятся. В препаратах 60-х — 70-х гг. обычно только 10–20 % были активны по простейшим тестам. Основная причина была в потере части белков во время переосаждений и промывок. Белки особенно легко теряются при высокой ионной силе раствора. Наоборот, при низкой ионной силе и низкой концентрации ионов магния происходит денатурация рРНК внутри рибосом и не всегда полностью обратимая. Как мы знаем, рРНК имеет очень сложную вторичную и третичную структуру, которую при достаточно глубокой денатурации не всегда удается восстановить. Нативная структура рРНК, в основном, сохраняется, если отделять белки от рРНК в уксусной кислоте (что и позволяет разбирать и вновь собирать рибосомы), но необратимо разрушается при стандартном выделении рРНК фенолом. Довольно долго шли дискуссии о том, все ли рибосомы активны в живой клетке, и во всех ли рибосомах присутствует полный набор р-белков. Позднее эти сомнения были устранены. Научились делать рибосомы, активные на 80–100 % по всем тестам. Это было сделано не на основании какого-то нового понимания вопроса, а тщательным подбором условий выделения, очистки, хранения и самих экспериментов с ними. Так или иначе, но некоторые авторы утверждают, что добились скорости роста белковой цепи *in vitro*, сравнимой с той, что имеет место в живой бактериальной клетке.

Несмотря на мощный прогресс, бесклеточные системы трансляции годятся только для аналитических работ, для препаративного синтеза они непригодны по причине слишком малого выхода продукта (порядка долей процента от всего белка в системе, т. е. в лучшем случае — порядка 100 мкг/мл). Причина этого не установлена, несмотря на неоднократные попытки.*)

*) Недавно появилось сообщение о том, что удалось добиться синтеза до 6 мг белка на 1 мл бесклеточной системы (T. Kigawa et al., FEBS Letters 442, 15–19, 1999)

Не исключено, что существенным для быстрой трансляции является взаимодействие рибосом и других компонентов системы с внутриклеточными мембранами, нарушаемое при вскрытии клеток. Такое взаимодействие может, например, на несколько порядков величины ускорить диффузию реагирующих компонентов к месту реакции. Такое ускорение, за счет замены трехмерной диффузии на двухмерную, и, тем более, одномерную, доказано, например, для взаимодействия репрессор — оператор в ДНК. Зато уж для аналитической работы эти системы незаменимы! Огромная часть наших знаний о трансляции получена с их помощью, и не могла быть получена иным способом.

В последнее время ведется разработка препаративно работающей системы. Перспективы применения — огромны, но о реальных успехах пока не слышно. М.б.ть, фирмы засекречивают. Методическое руководство — см., например, [Ausbel et al., 1995].

Стоит добавить, что экспрессировать многие белки можно сейчас и *in vivo*, например, в *E.coli* с гена, включенного в какой-либо подходящий вектор. Таким образом можно избежать многих трудностей, связанных с использованием бесклеточной системы, и во многих случаях получить количество индивидуального белка, достаточное для физико-химических исследований. Кроме очевидного практического применения, этот способ открывает также много возможностей для исследования. Например, можно получить белки с аминокислотными заменами в любых желаемых местах. Но во многих отношениях бесклеточные системы остаются незаменимыми.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шанвиль Ф., Энни А. -Л. Биосинтез белка, М., Мир, 1977
2. Бреслер С.Е. Введение в молекулярную биологию, Наука, М. -Л., 1966
3. Johnson J.L., Craig E.A. Protein folding in vivo. Cell 90, 201–204 (1997)
4. Биосинтез белка и нуклеиновых кислот, под ред. А.С.Спирина, Наука, М., 1965
5. In vitro transcriptional and translational protocol (Methods in molecular biology, V.37), Tymms M.J. (ed), 1996
6. Ausbel F.M. et al. Short protocols in molecular biology. A compendium methods from current protocols in molecular biology, 3rd edition, Wiley & Sons, 1995
7. Lewin B. Genes, Oxford University Press, Oxford, 1994 (Льюин Б. Гены, М., Мир, 1987)
8. Уотсон Дж. Молекулярная биология гена, М., Мир, 1978

2. РИБОСОМЫ

2.1 СОСТАВ И СТРУКТУРА РИБОСОМЫ

Рибосомы — рибонуклеопротеиновые частицы. Они есть во всех живых клетках и удивительно устойчивы в эволюции, хотя все же заметно различаются у про- и эукариот. Рассмотрим сначала прокариоты на примере клеток *E.coli*.

Бактерии регулируют количество рибосом пропорционально квадрату скорости роста клеток. Количество рибосом достигает 20 тыс. (а по некоторым данным — даже до 70 тыс.) на клетку, составляя до 30–40 % сухой массы бактерии. В эукариотах их много меньше, не более 5 % по массе.

На электронно-микроскопической фотографии *E.coli* выглядит как мешок с рибосомами. рРНК+тРНК составляют до 95 % всей РНК клетки, и 40 % всей энергии клетка расходует на синтез рибосом. Естественно, четкое регулирование синтеза рибосомных компонент имеет первостепенное значение для клеток. Благодаря трансляционной обратной связи синтез всех (вероятно) рибосомных белков зависит от присутствия не связанной в рибосомах рРНК. Так что первично регулируется синтез рРНК. Об этом см. раздел рРНК.

Каждая рибосома — большой, но компактный рибонуклеопротеидный комплекс. У эубактерий он имеет молекулярную массу около 2,5 млн Да и содержит около 55 % воды. В электронном микроскопе 70S рибосомы *E.coli* имеют размер 220 Å. Константа седиментации в нормальных условиях (20°С, буфер pH 7,5, 10 mM Mg²⁺, 100 mM NH₄⁺ или K⁺) — 70 ед. Сведберга (70S).

Рибосома у всех без исключения организмов состоит из большой и малой субчастиц, одна, примерно, вдвое больше другой. У бактерий эти субчастицы имеют константы седиментации 50S и 30S. В “естественных условиях” субчастицы ассоциированы, но легко диссоциируют при понижении концентрации Mg²⁺ до 1–0,1 mM; повышение ионной силы раствора (до 1 M) способствует диссоциации.

Малая субчастица состоит из одной молекулы рРНК (16S, у *E.coli* — 1541 нуклеотид) и 21 белка (S1–S21) с мол. массой от 8 до 27 тысяч Да, большая — из двух молекул рРНК (5S, у *E.coli* — 120 нуклеотидов, и 23S — 2904 нуклеотида) и 34 белков (L1–L34).

Нумерация белков возникла случайно и никаких свойств и функций рибосомных белков не отражает. Почти все белки — разные и представлены в комплексе в одном экземпляре, только L7, L12 и м.б. L18 — в 2 экземплярах. Кроме того, L7 и L12 отличаются только ацетилом на N-конце, L8 является комплексом двух пар L7/L12 и L10, а L26 и S20 — идентичны друг другу.

Всего в рибосоме прокариот 66 % рРНК и 34 % белка.

Все рибосомы прокариот сходны между собой. Рибосомы эукариотного типа у разных организмов также сходны между собой и относятся к другому классу. Они несколько сложнее, больше, и содержат больше белков (75–90 штук, грубо говоря, на 50 % больше по весу). Константа седиментации таких рибосом — 80S, субчастиц — 40S и 60S, рРНК — 4 молекулы: 18S в малой субчастице (1874 нуклеотида у позвоночных), а в большой — 5S (120 нуклеотидов) и 28S (4718 оснований у позвоночных) и, дополнительно, может присутствовать еще 4,5S или 5,8S (60 нуклеотидов). Последние оказались аналогами 3'- или 5'-концов эубактериальной 23S рРНК. Молекулярная масса — порядка 4,5 млн дальтон, из которых 60 % приходится на рРНК.

Удивительное сходство рибосом в разных организмах указывает на жесткость структурных требований к ним. Соответственно, белки и РНК рибосом очень консервативны, белки — в пределах одного “царства”, а рРНК — вообще во всех организмах.

Правда, позднее оказалось, что рибосомы митохондрий и хлоропластов (как, впрочем, и тРНК некоторых митохондрий) сильно отличаются от стандартных по молекулярной массе и соотношению рРНК/белок, и, тем не менее, вполне работоспособны. Все же они достаточно близко напоминают рибосомы зубактериального типа. Это, как и многие другие характеристики, подтверждает предположение об их происхождении из древних прокариотных эндосимбионтов.

Форма и структура рибосомных частиц успешно изучается электронно-микроскопически. Хорошие электронно-микроскопические снимки, сделанные с помощью оттенения напылением металла под малым углом, позволили разглядеть рельеф рибосомных субчастиц. Позднее методика была усовершенствована. Например, получены и изучены двумерные решетки, а компьютерное совмещение сотен и даже тысяч изображений позволило заметно улучшить электронно-микроскопическую картину. Как это выглядит на фотографии и на пластилиновой модели, построенной на основе подобных фотографий — видно на рисунках 2.1а и 2.1б.

Оказалось, что поверхность рибосомы не гладкая и можно видеть много особенностей рельефа. Это очень существенный момент, поскольку эти особенности дают координаты на поверхности рибосом, относительно которых можно сориентировать расположение отдельных рибосомных белков. С этой целью под электронным микроскопом наблюдают присоединение к поверхности рибосомных субчастиц антител к отдельным рибосомным белкам. (см. Рис. 2.1а). Такие антитела в свое время научился делать Штоффлер (это не просто!)

Сшивки бифункциональными реагентами позволили выяснить примыкающие друг к другу белки и контакты белков с рРНК. Места присоединения белков к рРНК определяются, кроме того, по “футиринтам” — участкам рРНК, защищенным тем или иным белком от химической или энзиматической модификации.

Энгельман с сотр. проделал большую работу по рассеянию нейтронов, которая позволила определить поочередно расстояния между отдельными парами дейтерированных белков, встроенных в недейтерированную субчастицу.

Можно провести также скрининг “оголенных” участков рРНК, связывая с ними меченые синтетические комплементарные олигонуклеотиды.

Все эти и другие подходы в совокупности позволили построить надежную пространственную модель рибосомы.

Сейчас постепенно электронно-микроскопические методики совершенствуются. Компьютерный “image reconstruction” двумерных кристаллов и одиночных рибосом в электронном микроскопе дал 25Å-разрешение структуры рибосом из *E. coli*. Новое большое достижение — электронная микроскопия “ice-embedded” рибосом (“криоэлектронная микроскопия”). Электронный микроскоп с фильтрацией энергии электронов позволяет устранить проблему неэластичного рассеяния электронов от воды. Существенно, что в этом случае визуализируются замороженные в воде рибосомы, в то время, как раньше видели только “сушеные” рибосомы; конечно, при этом возможны были искажения.

Удалось также получить настоящие кристаллы рибосомных субчастиц и рентгеноструктурный анализ дает разрешение 10Å и даже 6Å. Для исследования применяется синхротронное рентгеновское излучение, мощное, хорошо коллимированное и очень монохроматичное.

В результате электронно-микроскопических и рентгеноструктурных исследований удалось разглядеть множество структурных деталей: на 30S главные из них — head(h), platform(p), base, на 50S — L1 arm(L1), central protuberance (выпуклость, CP), stalk (стебель, St), spur (отросток, Sp), а между субчастицами — interface canyon (ущелье, IC) и мостики. Видно межсубъединичное пространство, куда, по современным предположениям, помещается мРНК, тРНК и факторы. Новые подробности позволяют наметить детально расположение мРНК и насцентного полипептида; намечается также и область пептидил-трансферазного центра (ПТЦ-центра) и

a)



б)

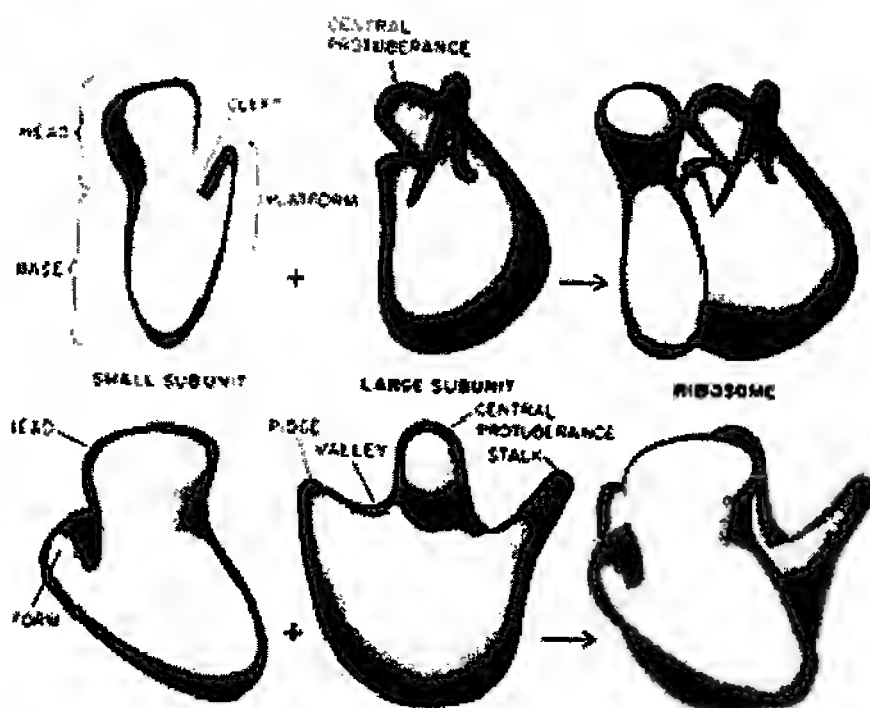


Fig. 2.1 a) — electron micrographs of ribosomes, b) — schematic diagram of ribosome structure.

Рис. 2.1 а) — электронно-микроскопические фотографии. Пары образованы благодаря взаимодействию с антителами к рибосомным белкам. б) — модель рибосомы, построенная на основании электронно-микроскопических данных

антикодон-связывающая область (см. Рис 2.16 и 2.2). Выявились и более мелкие подробности: “шейка” тридцатки имеет канал, ведущий от цитоплазмы к межсубчастичному пространству. Чашевидная платформа тридцатки образует расселину, в которую ведет канал. На дне расщелины между субчастицами начинается тоннель, который затем разветвляется и выходит наружу в разных местах на тыльной части 50S. Предполагается, что это тоннель для выхода насцентного белка. В обзоре Green, R. & Noller, H.F. на 30S видны: головка, шейка, расщелина, платформа (head, neck, cleft, platform), а на 50S — шейка (neck) пронизана каналом от внешнего пространства к расщелине (cleft) через который проходит мРНК. Имеется явная полость (cavity) между субчастицами, куда могут поместиться три молекулы тРНК. На стенке каньона между субчастицами виден вход в предполагаемый туннель для полипептида. Туннель раздваивается и ведет к двум выходным отверстиям на задней стороне, возможно, для отдельного выхода мембранных и цитоплазматических белков.



Рис. 2.2 Поверхность 50S субчастицы при высоком разрешении

Несмотря на то, что некоторые из этих данных нуждаются в подтверждении и есть расхождения у разных авторов, в основном, картины сходятся.

Этими методами, дополненными данными по мутагенезу рРНК, на рибосоме постепенно локализуют “сайты”, к которым присоединяются тРНК, факторы трансляции, мРНК, антибиотики и другие лиганды. Пока не хватает динамических данных, но и они будут, вероятно, получены. Особенно впечатляют самые последние работы, в которых удается рассмотреть самые интимные детали устройства функционально наиболее значимых областей (декодирующего участка, ПТИЦ).*)

*) В настоящее время получены картины электронной плотности 50S и 30S субчастиц рибосом, полученные рентгеноструктурным анализом кристаллов с разрешением, соответственно, 2,4 и 3 Å. На них можно проследить ход цепочек рРНК, расположение почти всех белков относительно рРНК, выявить пространственную структуру, расположение тРНК на сайтах и даже идентифицировать пептидилтрансферазный центр. Удалось также доказать с большой степенью определенности, что реакцию транспептидации катализирует рРНК и белок в катализе не участвует (Science 289, 11 August (2000), Nature(London), 407, 21 September (2000)).

В результате некоторые приведенные здесь данные имеют теперь, в основном, историческое значение.

2.2 РАЗБОРКА И СБОРКА РИБОСОМ

Важной для изучения рибосом является возможность их разборки на рРНК и белки и последующей обратной сборки с восстановлением биологической активности. Эта процедура, особенно трудная для больших субчастиц, дает массу экспериментальных возможностей.

Совершенно очевидно, что такой сложный агрегат, как рибосома, образуется из составляющих (белков и рРНК) не одновременно, а поэтапно. Этот процесс сборки изучали и *in vivo* и *in vitro*. Последнее возможно потому, что в середине 60-х гг. научились разбирать рибосомы бактерий на белки и РНК и потом их собирать снова с восстановлением активности на 50 и даже 100 %. Конечно, огромный агрегат, удерживаемый нехимическими силами, требует бережного обращения. Уже говорилось, что вначале обычно препараты отмытых от факторов рибосом были активны только на несколько процентов, и лишь намного позднее научились получать рибосомы на 80–100 % активные в разных тестах. Это очень важное достижение. Одно из главных требований - никогда не допускать чрезмерно низкой концентрации ионов магния (ниже порядка 1 мМ) - это чревато необратимой денатурацией рРНК — и высокой ионной силы (порядка 1 М) — это чревато потерей белков.

Процессы сборки в природе и в пробирке различаются. В клетке найдены предшественники 30S — частица p1(21S), содержащая не все белки, и p2 (30S), содержащая все белки, но недозревшую 16S. *In vitro* сборка происходит хорошо, если правильно подобран состав буферного раствора, при pH 7-8, и с обязательным присутствием ионов Mg^{2+} и K^+ или NH_4^+ . Сначала на холоду образуется предшественник, RI-3O, содержащий 15 белков, но он нуждается в активации прогревом. Обычно активируют при 40°С 20 мин. Зависимость от температуры дает энергию активации 63 ккал/моль. При прогреве присоединяются остальные белки и возникает активная 30S субчастица.

Более сложно идет сборка 50S субчастицы. В клетке *E. coli* найдены три предшественника: p1 (34S), p2 (43S), p3 (почти 50S). p2 в присутствии белков и аденозин-метилирующего фермента можно *in vitro* превратить нативную 50S. Условия реконституции *in vitro* искали долго. Оказалось, что требуются две стадии активации при разных концентрациях Mg^{2+} : 4 мМ (44°С 20 мин) и 20 мМ (50°С 90 мин), потому, что первоначальные и последующие стадии сборки имеют разные оптимумы по концентрации ионов магния. Что именно происходит при активации, и чем заменен прогрев в живой клетке? Пока не вполне ясно. Но разница огромна: минуты *in vivo* при 37°С и полтора часа *in vitro* при 50°С.

Известно только, что укладка рРНК зависит от метилирования ее и что существуют специальные белки — шапероны, катализирующие правильную укладку рРНК после процессинга.

2.3 РИБОСОМНЫЕ БЕЛКИ

Как в клетке обеспечивается стехиометрия по всем 60 рибосомным компонентам, в т.ч. по белкам? И как обеспечивается соотношение рРНК-белок? Это происходит благодаря многим регуляторным обратным связям, причем, как уже говорилось, первично регулируется рРНК, а белки подстраиваются к ней.

Возможность реконституции послужила методической основой для массы исследований, касающихся роли отдельных белков и определения мест в рРНК, с которыми те или иные белки связываются. В частности, можно собирать субчастицы без одного или нескольких белков, или менять последовательность их присоединения и наблюдать, какие же функции рибосом утрачиваются. Как ни странно, треть рибосомных белков (в *E. coli* 16!) не обязательны, т.к. даже описаны жизнеспособные мутанты, у которых тот или другой белок, и даже два одновременно, отсутствуют. Это не значит, что они не нужны, они могут, например, ускорять сборку, и т.д. Определенно ускоряют сборку белки S16 и L15. Соответственно, мутант без L15 имеет время генерации в 2–3

раза большее, чем дикий тип. Таким образом установили, что часть белков взаимодействует непосредственно с рРНК, а с ними уже связываются остальные. По Cachia et al. (1991) 9 из 21 белка 30S — “коровые”, непосредственно связанные с рРНК (Рис. 2.3).

In vivo показано, что только 2 белка — L3 и L24 иницируют процесс сборки 50S, остальные присоединяются после них. Без некоторых белков субчастица не собирается (L16, L20, L24); мутанты, где они отсутствуют — не найдены. Можно также искать мутанты по рибосомным белкам, у которых утрачена та или иная функция, например, чувствительность к антибиотикам (стрептомицину, спектиномицину, хлорамфениколу и многим другим), или даже, наоборот, появилась чувствительность к ним.

Но, вообще говоря, так и не удалось приписать тому или иному белку строго определенную функцию. Хотя, несомненно, многие белки участвуют в той или иной функции. Но вне рибосом ни один из белков никаких функций не выполняет.

Сейчас все или почти все рибосомные белки *E.coli* и многие — из других бактерий и из дрожжей не только секвенированы, но и их гены клонированы. Почти все они совершенно разные. Известна также и первичная структура многих р-белков из других организмов. Гомологичность белков по первичной структуре очень велика внутри одного царства (в среднем, 60 % даже для грам-положительной *Bac. stearothermophilus* и грамотрицательной *E.coli*). И вопрос об аналогичности самих белков решается просто. Аминокислотная гомология с р-белками хлоропластов растений — примерно, такая же. Что касается рибосомных белков эукариот, то, опять-таки, внутри царства гомология велика, но с р-белками прокариот достоверных гомологий немного. Нумерация р-белков эукариот, как и прокариот, тоже возникла исторически и не связана со свойствами и функциями, а также с нумерацией р-белков прокариот. Поиск аналогов не прост, но в некоторых случаях он удается, например, путем кросс-замен при реконституции рибосом. Считается, что вторичные и третичные структуры гомологичных белков должны быть подобны, и это подобие может иметь место и при различающихся первичных структурах.

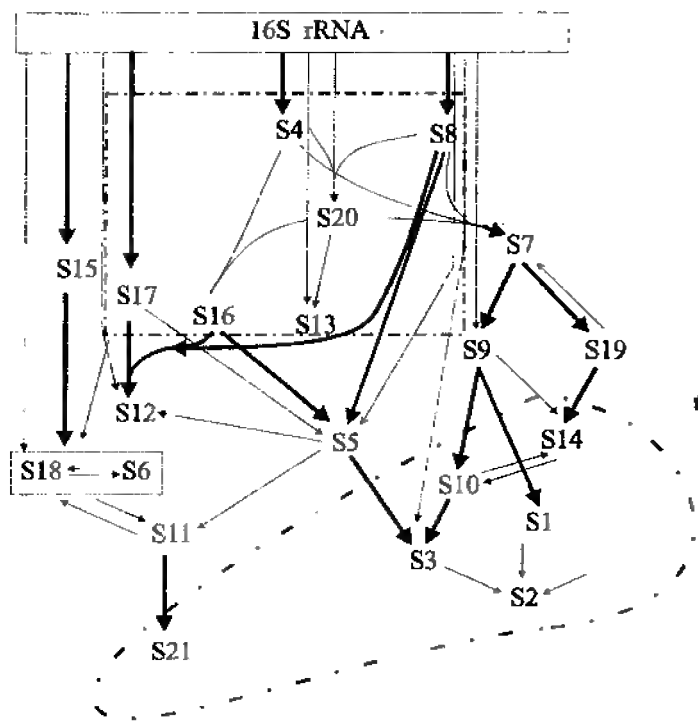


Рис. 2.3. Схема сборки 30S субчастиц из белков и 16S РНК. Толщина стрелки указывает на интенсивность взаимодействия. Пунктирной линией обведены так называемые “split”-белки S1-S3, S10, S14, S21, которые легко диссоциируют из рибосомы при высокой ионной силе.

Структурные аналогии между местами на рибосоме и на мРНК для связывания регуляторных рибосомных белков были продемонстрированы в большинстве исследованных случаев, хотя и не во всех. Здесь тоже не все выяснено.

У дрожжей 75 р-белков, почти все включены в рибосому по одному. Они транслируются в цитоплазме и направляются в ядро, где присоединяются к транскрибируемой там предшественнице рРНК и где формируются и созревают 40S и 60S субчастицы. Гены р-белков рассеяны по разным хромосомам и не организованы в опероны, как у бактерий. Некоторые гены существуют в одной копии, а большинство — в двух. Большинство — имеют интроны. Регулирование изучено хуже, чем у *E.coli*, но, несомненно, оно сильно отличается у прокариот и у дрожжей. У последних регулировка идет, повидимому, в основном, на уровне транскрипции. До сравнительно недавнего времени механизм координации синтезов рРНК и р-белков у дрожжей не были понятны.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шанвиль Ф., Энни А. -Л. Биосинтез белка, Мир, М., 1977
2. Lewin B. Genes Oxford University Press, Oxford, 1994. (Льюин Б. Гены, М., Мир, 1987)

К нн. 2.1-2.3

1. Green R., Noller H.F. Ribosomes and translation Annu.Rev.Biochem. 66:679-716 (97) 129, 1991
2. Шанвиль Ф., Энни А. -Л. Биосинтез белка, Мир, М., 1977
3. Биосинтез белка и нуклеиновых кислот, под ред. А.С. Спирина, Наука, М., 1965
4. Raue H.A., Planta,R.J. Ribosome biogenesis in yeast Progr.nucl.acid res.mol.biol. 47:89-129 (1991)
5. Frank J., Zhu J., Penczek P., Li Y., Srivastava S., Verschoor A., Rademacher M., Lata R.K., Agrawal R.K. A model of protein synthesis based on cryo-electron microscopy of *E.coli* ribosomes Nature 376(6530):441-444, 1995
6. Yonath A. et al. Approaches to the determination of the three-dimensional architecture of ribosomal particles, p.729 741 In: Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biology, v.52, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1987.
7. Nagano K., Harel M. Approaches to a three-dimensional model of *E.coli* ribosomes Progress in biophysics and molecular biology 48: 67-101, 1987
8. Dube P., Bacher G., Stark H., Mueller F., Zemlin F., Van Heel M., Brimacombe R. Correlation of the expansion segments in mammalian rRNA with the fine structure of the 80S ribosome: a cryoelectron reconstruction of the rabbit reticulocyte ribosome at 25A resolution J.Mol.Biol. 277(2):333-345, 1998
9. Ban N., Freeborn B.R., Nissen P., Penczek P., Grassucci R.A., Sweet R., Frank J., Moore P.B., Steitz T.A. A 9A resolution X-ray crystallographic map of of the large ribosomal subunit Cell 93(7):1105-1115, 1998
10. Wittmann H.G., Littlechild J.A., Wittmann-Liebold B. Structure of ribosomal proteins. In: Ribosomes: structure. function and genetics. Chambliss G., Graven G.R., Davies J., Davis K, Kahan K. Nomura M. (eds), University Park Press, Baltimore, 1980 p. 51-88
11. Wittmann H.G. Structure of ribosomes. In: Structure, function, and genetics of ribosomes, Hardesty B., Kramer G. (eds), Springer-Verlag, New York, 1985, p.1-27
12. Nierhaus K.H. The assembly of prokaryotic ribosomes Biochimie 73(6),739 755(91)
13. Nomura M. The role of RNA and protein in ribosome function: a review of early reconstitution studies and prospects for future studies, Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol. 52:p.653-663, 1987
14. Dabbs E.R. Mutants lacking individual ribosomal proteins Biochimie 73:639-645 (91)
15. Nomura M., Gourse R.L., Baughanan G. Regulation of the synthesis of ribosomes and ribosomal components Annu.Rev.Biochem. 53:75 117, 1984

2.4 РИБОСОМНАЯ РНК

2.4.1 ГЕНЫ РРНК И ИХ РЕГУЛИРОВАНИЕ

Именно регуляция транскрипции рРНК в клетках является первичной. Синтез белков подстраивается к синтезу рРНК. Антибиотиком хлорамфениколом можно остановить синтез клеточных, в т.ч. рибосомных, белков, а синтез рРНК еще долго продолжается.

Поскольку рибосом в клетках очень много, генов рРНК в клетках имеется несколько. Например, в *E.coli* имеется 7 оперонов рРНК (rrnA-rrnH) и все они картированы. Несмотря на такое их количество, транскрибироваться им приходится очень активно. Гены тРНК обычно однокопийные, они тоже очень активно транскрибируются.

С этих генов синтезируется более 90 % всей РНК зубактериальной клетки, хотя в последней имеется около 4000 генов. Т.е. гены стабильных РНК работают очень активно! Очевидно, что необходимы мощные регуляторные механизмы для того, чтобы активировать или останавливать систему при необходимости. Есть, по крайней мере, два регуляторных механизма: зависящий от условий роста (скорость синтеза рРНК пропорциональна квадрату скорости роста), и так называемый stringent control (торможение при голодании по какой-либо аминокислоте).

Каждый рРНК-оперон *E.coli* состоит из гена 16S, спейсера с 1–2 тРНК, гена 23S, гена 5S, и в некоторых оперонах в дистальной области кодируется еще тРНК и 5S рРНК (Рис. 2.5). Некоторые опероны полностью сиквенированы и клонированы. Гены A,B,E и C сидят рядом, D,G,H — разбросаны по геному. Отличия между ними есть, хотя и небольшие.

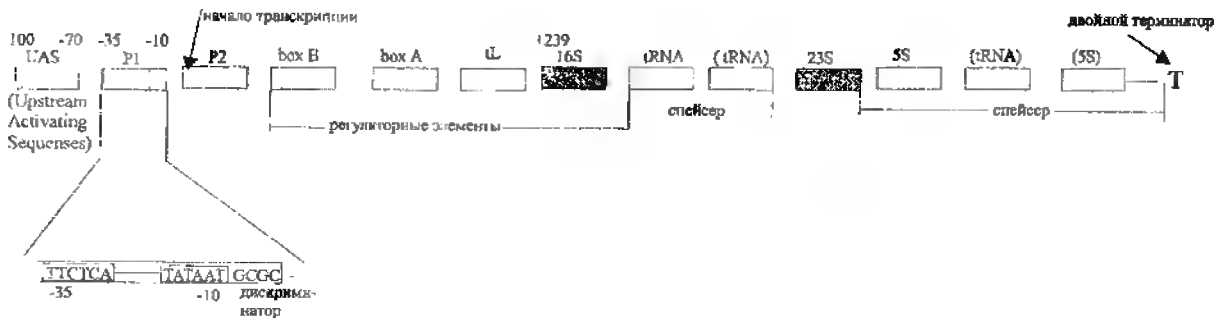


Рис. 2.5. Оперон стабильной РНК (рРНК) в *E.coli* (не в масштабе)

Еще того болсе, у дрожжей имеется 100–200 tandemных повторов рДНК в хромосоме XII. Оперон включает гены 18S, 5,8S и 28S, транскрибируемые РНК-полимеразой I, спейсер 2,5 килобаз с геном 5S, читаемым в обратном направлении полимеразой III. Гены белков, 5S рРНК и остальных стабильных РНК транскрибируются тремя разными полимеразами.

В растениях имеется 1–2 тысячи генов рРНК.

Транскрипцию всех генов рРНК в *E.coli* производит одна и та же РНК-полимераза.

Транскрипция rrnH начинается с двух сильных tandemных промоторов P1 и P2 на расстоянии около 120 пар оснований (Рис. 2.5). Зачем это? Пока было не очень ясно. Но свойства их разные: P1 работает при экспоненциальном росте, P2 — в основном, при медленном росте. Транскрипция начинается внутри P2. Промоторы включают два регуляторных гексануклеотидных участка на расстоянии 16–18 пар оснований друг от друга. В конце P1 в генах стабильной РНК найдена также консервативная область GCGCCNC от –1 до –7, которой нет у белковых генов и которая, вероятно, важна для stringent регуляции.

Промоторы рРНК на порядок активнее промоторов белковых генов, но это зависит не столько от них, сколько от лидерной области, где имеется несколько дополнительных регулировочных элементов. Они сиквенированы. Например, имеется upstream последовательность UAS (Upstream Acting Sequence) и несколько регуляторных “боксов” как перед, так и после промоторов.

Синтез длинного предшественника рРНК (копии всего оперона) идет одновременно с процессингом и сборкой в рибосому. В эукариотах это, естественно, происходит в ядре, куда транспортируются р-белки, синтезируемые в цитоплазме. Терминация идет на двух тандемных сигналах терминации.

Однако, механизм синхронизации синтеза стабильных РНК и его регулирования не был до недавнего времени понятен. Номура например, не без оснований предположил, что именно уже собранные рибосомы через каких-то посредников супрессируют дальнейшую транскрипцию рРНК.

Известно, также, что синтез стабильных РНК активируется взаимодействием регуляторной области гена с регуляторными белками. Есть несколько подозреваемых активаторов и репрессоров, например, Fis-белок (“фактор инверсии стимуляции”) (участвующий также в процессе рекомбинации вирусной ДНК) явно сильно стимулирует инициацию транскрипции, вероятно, за счет взаимодействия с UAS. Вообще, процесс регулирования очень сложен и не до конца изучен, и я не буду здесь анализировать эти не устоявшиеся данные.

Очень интересен механизм stringent-контроля. В условиях голодания хотя бы по одной аминокислоте в клетках *E.coli* сразу же появляется в большом количестве гуанозин тетра(пента)фосфат (p)ppGpp. Предполагается, что накопление при аминокислотном голодании деацилированной тРНК приводит к запуску механизма контроля: эта тРНК, связавшись с А сайтом рибосом вместо тройного комплекса, запускает синтез ppGpp. Медиатор ppGpp осуществляет несколько регуляторных функций в клетках. Повидимому, через P1 он осуществляет stringent-relaxed контроль, т.е. сразу же останавливает транскрипцию не только рРНК, но и тРНК при аминокислотном голодании. При “relaxed” фенотипе (*rel⁻*) такая остановка происходит очень нескоро. Через ppGpp как-то реализуется также и зависимость синтеза рРНК от (квадрата) скорости роста. Предполагается, что рецептором ppGpp служит последовательность -GCGC- в 3'-конце P1. Но и этот механизм не полностью изучен. Тетрафосфат — продукт белка, кодируемого геном *relA*, и клетки, лишённые этого гена имеют “relaxed” генотип. Но путей синтеза ppGpp есть, по меньшей мере, два. Мутации *rel* обнаруживаются в нескольких местах генома, действие их продуктов не вполне понятно. Вообще, эффект ppGpp - плеiotропный и не до конца понятный. Каким образом им репрессируется транскрипция рРНК - тоже не выяснено, поскольку модели *in vitro* не дают стабильных результатов.^{*)} Вообще говоря, пока не известно, одинаковый ли механизм управляет синтезом рибосом (в том числе рРНК) при разных изменениях условий.

2.4.2 ПРОЦЕССИНГ РРНК

Имеет место процессинг двух видов: образование и укладка рРНК из предшественника, и модификация нуклеотидов, в основном, метилирование. Полный предшественник (“30S precursor rRNA”) начинает расщепляться в области спейсера еще до окончания полного синтеза. Ответственной является РНКазы III, поскольку нерасщепленный предшественник находят только в клетках, где она отсутствует. Вероятно, параллельно расщеплению рРНК сразу же встраивается в рибосомы. РНКазы III процессирует пре-рРНК также и *in vitro*. Но, вообще, процесс созревания не очень прост и не до конца изучен. В частности, штаммы без РНКазы III вполне жизнеспособны. С другой стороны, после этой РНКазы остаются еще “хвосты”: у 16S – 115 и 33 нуклеотида, а у 23S – 7 и 9 нуклеотидов на 3' и 5' концах, соответственно. Окончательное созревание происходит в уже собранных рибосомных субчастицах а 50S — даже в полисомах, и этот процесс, вероятно, представляет собой важный этап, дающий активную субчастицу.

5S рРНК тоже процессируется РНКазой E из предшественника, 9S, с последующим созреванием уже в составе рибосомы

^{*)} Недавно показано, что, по крайней мере, одна мишень ppGpp — РНК полимеразы (Toulokhonov I.I. et al., J.Biol.Chem. (2000), in press)

В 16S *E.coli* модифицированы 11, а в 23S - 23 нуклеозида. Большая часть из них - метилирована по основанию, несколько — по рибозе, несколько - псевдоуридины (один-в 16 S и 10 – в 23S). Два m⁶A в 16S сидят рядом (1517/1518), остальные разбросаны, но группируются вокруг функционально значимых участков. Упомянутая пара, возможно, помогает образованию инициаторного комплекса, а именно, связыванию IF3, а отсутствие четырех определенных метильных групп приводит к устойчивости к антибиотику касугамицину. В эукариотах рРНК тоже метилируется. У млекопитающих в 18S метилировано 43 нуклеотида, в 28S—74 (2 % от всего количества).

Самые последние работы обнаружили интереснейший механизм выбора нуклеотидов рРНК эукариот для последующей модификации с помощью коротких молекул РНК, комплементарных к нужному участку рРНК. Этот механизм сейчас изучается.

ЛИТЕРАТУРА к п.п. 2.4.1.–2.4.3

1. *Zacharias M., Thiessen G., Bradaczek C., Wagner R.* Analysis of sequence elements important for synthesis and control of ribosomal RNA in *E.coli*. *Biochimie* 73(6), 699–712 (1991)
2. *Lamond A.I., Ehrenberg M.* The control of stable RNA synthesis in bacteria. *TIBS* 10(7), 271–274 (1985)
3. *Lindahl L., Zengel J.M.* Ribosomal genes in *Escherichia coli*. *Annu.Rev.Genetics* 200, 2970–3260 (1986)
4. *Hawley D.K., McClure V.R.* Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 11(8), 2237–2255 (1983)
5. *Nomura M., Gourse R.L., Baughman G.* Regulation of the synthesis of ribosomes and ribosomal components. *Annu.Rev.Biochem.* 53, 75–117 (1984)
6. *Gourse R.L., Goal T., Bartlett M.S., Appleman J.A., Ross W.* rRNA transcription and growth rate-dependent regulation of ribosome synthesis in *Escherichia coli* *Annu.Rev.Microbiol.* 50, 645–677 (1996)
7. *Srivastava A.K.* et al. Structure and organization of ribosomal DNA *Biochimie* 73(6) 631–638 (1991)
8. *Planta R.J., Mager W.H., Leer R.J., Woudt L.P., Raue H.A., El-Baradi T.T.A.L.* Structure and expression of ribosomal protein genes in yeast In: Structure, function and genetics of ribosomes *Hardesty B., Kramer G.* (eds.) pp. 699–718. Springer-Verlag, New York, 1986
9. *Noon K.R., Bruenger E., McCloskey J.A.* Posttranscriptional modifications in 16S and 23S rRNAs of the archaeal hyperthermophyle *Sulfolobus solfataricus* *J.Bacteriol.* 180(11), 2883–2388 (1998)
10. *Rayhaundhuri S., Conrad J., Laiu B.G., Ofengand J.* Functional effect of deletion and mutation of the *Escherichia coli* ribosomal RNA and tRNA pseudouridine synthase RluA *J.Biol.Chem.* 274(27) 18880–18886 (1999)

2.4.4 СТРУКТУРА РИБОСОМНОЙ РНК

Благодаря внутренним силам большие молекулы рибосомной РНК сворачиваются в очень сложные вторичные и третичные структуры. Хотя, естественно, эти структуры модифицируются р-белками, но, в основном, они остаются неизменными даже в составе рибосомы.

На Рис. 2.6 показана структура 16S рРНК. Она была установлена в результате длительной работы. Во-первых, были использованы программы, определяющие вторичную структуру по первичной на основании эмпирических термодинамических данных. Программы эти, правда, достаточно сложны и дают неоднозначные решения, если применяются для не очень коротких олигонуклеотидов.

центральный домен

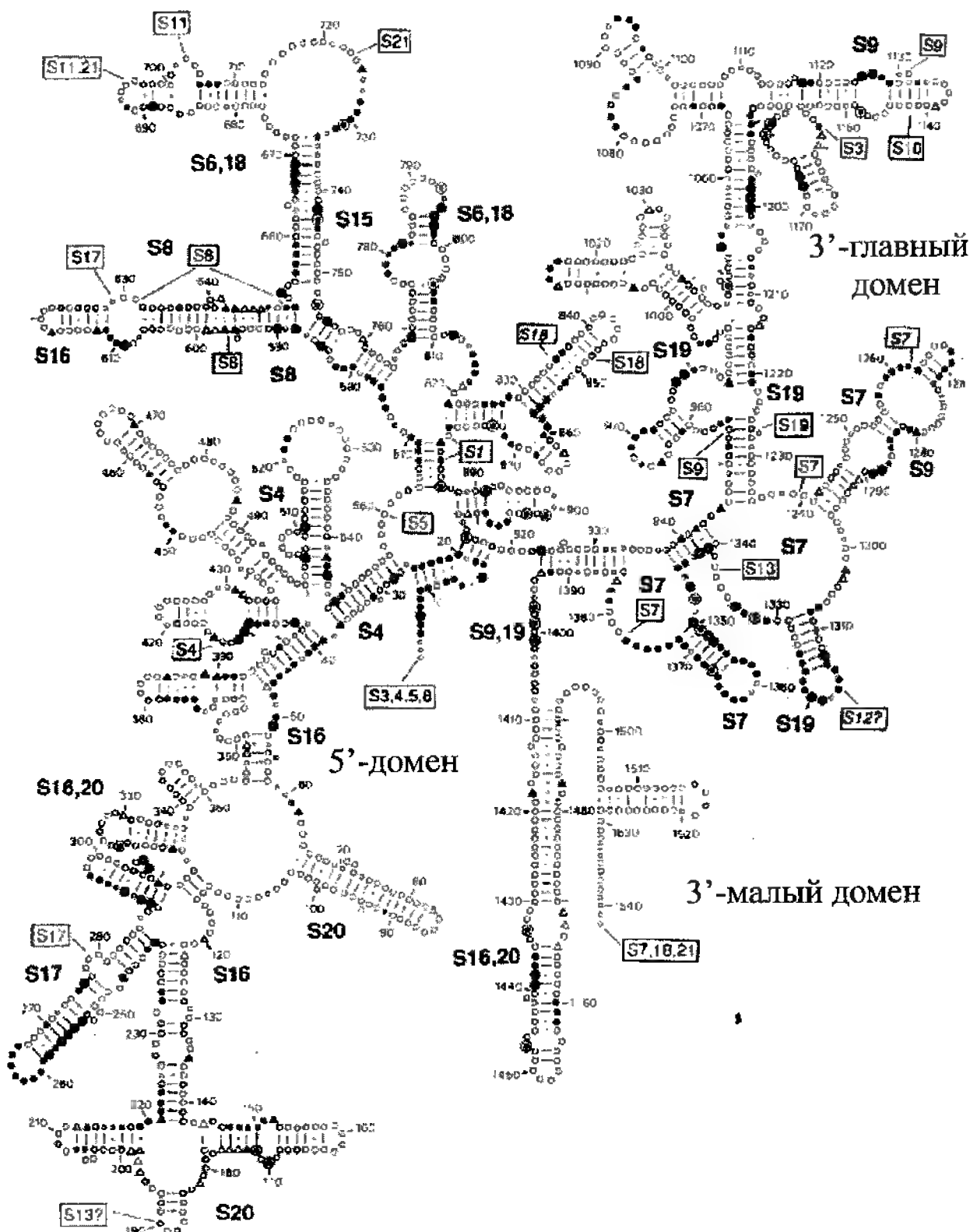


Рис. 2.6 Вторичная структура 16S рРНК E.coli

Один из самых мощных способов установления вторичной структуры - модификация рРНК реагентами, специфичными к основаниям, и именно к тем их атомным группам, которые могут быть вовлечены в эту структуру (например, диметилсульфат модифицирует в основаниях азот N7 гуанина и, слабее, N1 аденина; кетоксаль — N1 и N2 гуанина; производные карбодиимида модифицируют N3 у урацила и, слабее — N1 у гуанина, и т.д.). Реакция поэтому идет, естественно, только с атомами, не образующими водородные связи. После этого праймер-зависимая обратная транскриптаза останавливается на модифицированных местах и последующий электрофорез в геле показывает места модификации. Нужно только, чтобы модификация не заходила слишком глубоко. Имея пару десятков ДНК-праймеров, можно сканировать всю большую молекулу. Однонитевые участки обнаруживаются также по расщеплению специфичными к ним РНКазами.

Имеются и другие способы, например, химические сшивки бифункциональными реагентами, связывание коротких комплементарных олигонуклеотидов в однонитевых участках, и т.д.

Наконец, поскольку сейчас установлены сотни первичных структур рРНК из разных организмов и благодаря большой консервативности их, можно сравнивать и находить "связанные" парные замены нуклеотидов, появившиеся в процессе эволюции. С большой вероятностью можно утверждать, что такие замены соответствуют комплементарно связанным парам нуклеотидов. Нуклеотиды, входящие в некоторые из таких пар находятся в первичной структуре РНК далеко друг от друга, что указывает на третичные взаимодействия. Неконсервативных участков не много! Например, в области около нуклеотида C1400 в 16S rRNA имеется участок, практически, неизменный у 1000 организмов.

И 23S, и 16S рРНК явно разделяются на несколько доменов, не связанных, или слабо связанных вторичными и третичными структурами. Их локализация в трехмерной модели рибосомы установлена.

Некоторые из упомянутых выше методов пригодны также и для выявления мест взаимодействия рРНК с р-белками. Например, РНКазы позволили грубо локализовать несколько таких мест. Химические реагенты оказались гораздо более чувствительными, позволяя локализацию иногда с точностью до нуклеотида.

Поскольку пространственное расположение белков в рибосоме установлено достаточно подробно (из опытов по сборке субчастиц, иммуноэлектронно-микроскопически, из данных по рассеянию нейтронов), выявление точек их взаимодействия с рРНК позволяет пространственно локализовать в рибосоме отдельные петли и домены.

Приготовив дезоксирибонуклеотиды, комплементарные к желаемому участку рибосомной РНК, и связав их с рибосомой, можно выщепить желаемые области РНКазой N вместе с пришитым белком (или другим участком рРНК), выделить их и исследовать не только сиквенс, но и влияние любых нуклеотидных замен. Таким образом проведена огромная работа, например, по установлению аналогичных белков разных организмов. В бактериях, вообще, возможна сборка рибосом с белками (или отдельным белком) из другой бактерии. В эукариотах это не удавалось на полных рибосомах, но удавалось на белок-связывающих фрагментах рРНК, выделенных вышеупомянутым методом.

Таким образом, пространственная структура рибосом в значительной мере изучена. Мало того, аналогичными методами удалось установить участки связывания на рибосоме тРНК, мРНК, факторов трансляции, и ряда антибиотиков.

Наконец, последние достижения электронной микроскопии, рентгеноструктурного анализа кристаллов, малоуглового рассеяния нейтронов, позволили визуализировать на рибосоме тонкую структуру поверхности и белковые и РНКовые лиганды. *)

*) См. примечание к стр. 17

1. *Noller H.F.* Structure and topography of ribosomal RNA. In: Ribosomes: structure, function and genetics. *Chambliss G., Graven G.R., Davies J., Davis K., Kahan K., Nomura M.* (eds), University Park Press, Baltimore, pp.3–22, 1980
2. *Guttl R.R., Weiser B., Woese C., Noller H.F.* Comparative anatomy of 16S-like ribosomal RNA *Progr.nucl.acid res.mol.biol.* 32,155–216 (1985)
3. *Tinoco I.Jr., Bustamante C.* How RNA folds *J.Mol.Biol.* 293(2), 271–281(1999)
4. *Conn G.L., Guttl R.R., Draper D.E.* A functional ribosomal RNA tertiary structure involves a base triple interaction *Biochemistry* 37(34), 11980–11988 (1998)
5. *Santer M., Dahlberg A.E.* Ribosomal RNA: an historical perspective In: Ribosomal RNA: structure, evolution, processing, and function in protein biosynthesis, *Zimmerman R.A., Dahlberg A.* (eds.) Chapter 1. pp.3–19, CRC Press, Boca Ratin, 1996
6. *Triman K.L.* Mutational analysis of 23S ribosomal RNA structure and function in *Escherichia coli* *Advances in genetics* 41,157–195(1999)

2.5 ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ рРНК НА ФУНКЦИИ РИБОСОМ

В конце 80-х гг. рРНК была клонирована для многих организмов и стало возможно по желанию изменять ее первичную структуру. Но как изучить влияние этих изменений на функции рибосом? На этом пути были большие трудности. Они связаны с мультикопийностью генов рРНК, особенно у эукариотов (дрожжей), где их - сотни. Если ввести ген рРНК в плазмиде, то в клетке *E.coli* все же не менее 1/3 рибосом собирается с рРНК, экспрессированной с основного генома, и изменение некоторых функций, вызванное мутагенезом клонированной рРНК, маскируется. Правда, изменение скорости роста клеток часто заметно. Мало того, оказалось, что функционально-значимые мутации рРНК оказываются иногда доминантными летальными. Это связано с тем, что, если мутации в рРНК летальны, и этих рРНК много (в 2/3 всех рибосом), может иметь место конкуренция за связывание других компонент трансляции (мРНК, тРНК, факторов) и клетка становится нежизнеспособной. Но обычно мутации рецессивны, их трудно обнаружить на фоне рРНК из собственных генов организма.

Изобретено немало способов преодоления этих трудностей. Например, если рРНК синтезируется по клонированному гену *in vitro* с помощью Т7 РНК-полимеразы, рибосомы можно собрать и испытать *in vitro*. К сожалению, не всегда результаты испытаний адекватны тому, что имеет место *in vivo*. Например, замены в 16S C1400 и C1402 *in vitro* не влияют на свойства рибосом, а в клетках — влияют.

Еще способ — введение в рРНК селективных маркеров. Например, рРНК плазмиды можно мутировать так, что рибосомы делаются устойчивыми к антибиотикам (спектиномицину, эритромицину) и, если клетки культивировать в присутствии антибиотика, то синтез белков пойдет в них только на рибосомах с плазмидной рРНК. Можно сделать особую анти-Шайн-Дальгарно (SD)-последовательность в клонированной 16S так, что только эти рибосомы будут вести синтез на данной мРНК, если в нее ввести соответствующую “Шайн-Дальгарно”, и индикатором будет белок, кодируемый этой мРНК. Так что влияние вводимых в 16S мутаций будет наблюдаемо на нулевом фоне.

Используется феномен доминантности некоторых мутаций хромосомной рРНК. Например, трансформации можно подвергать клетки с термочувствительными рибосомами, так что при непермиссивной температуре трансляция пойдет только на “плазмидных” рибосомах.

Иногда удается предварительно “пометить” рибосомы введением некоторой нуклеотидной последовательности в функционально незначущую область рРНК и потом за их поведением наблюдать на фоне остальных, немеченых, рибосом. Например, в нейтральную область клонированной рРНК вводят специальный олигонуклеотид, от которого с помощью соответствующего праймера

производится сиквенирование близлежащего участка рРНК, который представляет интерес.

Некоторые организмы (археобактерии) имеют только один ген рРНК и их изучать проще. Есть и более изощренные методы.

Наконец, в самое последнее время появилось сообщение о том, что удалось нокаутить все семь оперонов рРНК в *E.coli* и заменить их клонированным геном, который функционирует, даже будучи взятым из другой бактерии (например, *Salmonella*). Так что открылись новые возможности для исследования.

В добавление к сказанному, упомяну об интересном типе мутаций рРНК, с которыми рибосомы становятся супрессорами. Например, делеция C1054 в 16S приводит к супрессии в двух из четырех терминирующих кодонов UGA в *trpA* гене (т.е. наблюдалась зависимость супрессии от контекста). Замена G на A в малой рРНК митохондрий дрожжей (в месте, соответствующем N517 *E.coli*) приводит к супрессии *ochre* (очень специфично). Наконец, замена в митохондриях дрожжей C1409 на другой нуклеотид супрессирует сдвиг рамки в определенных мРНК. В некоторых случаях мутации структурно расположены далеко от декодирующей области рибосомы и явно действуют косвенно, может быть, через искажение взаимодействия рибосомы с факторами. Найдены также и температурочувствительные мутации рибосом за счет рРНК (*ts* и *cs*). Они связаны с появлением или разрушением локальных вторичных взаимодействий в рРНК.

Удалось таким образом исследовать влияние мутаций рРНК на самые разные функции рибосом (о некоторых речь, в основном, впереди): на связывание белков (о нем уже говорилось), факторов трансляции, тРНК на A, P и E сайты, мРНК, субчастиц друг с другом, на ГТРАЗную и пептидилтрансферазную активности, на декодирование (ошибки трансляции), транслокацию, инициацию, терминацию, связывание и/или действие антибиотиков и других ядов.

Функционально значимые мутации часто оказываются точечными и концентрируются в определенных доменах.

Если сопоставить эти результаты с открытием ферментативной функции РНК (рибозимов в 1981–82 г.), с ролью РНК-частиц в процессинге рРНК и мРНК (напр., в сплайсинге), с наличием активной РНК-части в ферментах процессинга (в РНКазе Р), а также и с тем, что без рРНК рибосомные белки всегда функционально неактивны, напрашивается вывод о том, что именно рРНК, а не р-белки, несут основную функциональную нагрузку в рибосоме. Белки, в основном, только модифицируют эту функцию.

Уже говорилось о том, что, если в рибосоме отсутствует один белок, практически, любой, ни одна из ее функций не утрачивается, а только более или менее ослабляется. А вне рибосомы ни один из белков не выполняет ни одной функции.

Есть основания считать (хотя это и не доказано), что и главная активность рибосомы, образование пептидной связи, выполняется рибосомной РНК. Отсюда и гипотезы о том, что “первыми рибосомами” в процессе эволюции были молекулы РНК, которые лишь постепенно “обросли” белками*).

2.6 ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ СООТНОШЕНИЯ НА ОСНОВЕ рРНК

Поскольку рРНК есть у всех организмов, и первичные структуры их очень консервативны, т.е. медленно меняются в ходе эволюции, сравнение этих структур - почти идеальный способ изучения филогенетических соотношений эволюционно сравнительно далеких организмов. Как сравнение быстро меняющихся областей ДНК дает возможность установления родства людей, так и сравнение первичных структур рРНК позволяет установить степень родства живых организмов разных видов и классов. Сравнение генотипов априори предоставляет гораздо больше возможностей, чем единственно возможное в прежние времена сравнение фенотипов. Вспомним,

*) См. примечание на стр. 17

что для прокариот вообще не было надежного способа установления степени родства. Появляются также и возможности учета “нейтральных мутаций”, не отражающихся на генотипе. Конечно, у метода есть и ограничения. Но, тем не менее, уже пересмотрены многие установленные ранее родственные соотношения. Например, пришлось разбить прокариот на “домены” — “bacteria” и “archaea”, и притом последние в некоторых отношениях оказались ближе к эукариотам, чем к бактериям.

ЛИТЕРАТУРА к пп. 2.5–2.6

1. **Lewin B.** Genes, Oxford University Press, Oxford, 1994 (*Льюин Б.* Гены, М., Мир, 1987)
2. **Olsen G.J., Woese C.** Ribosomal RNA: a key to phylogeny FASEB J. 7(1), 113–(1993)
3. **Olsen G.J.** Phylogenetic analysis using ribosomal RNA Meth.enzymol. 164, 793–812 (1988)
4. **Triman K.L.** Mutational analysis of 23S ribosomal RNA structure and function in *Escherichia coli* Advances in genetics 41, 157–195 (1999)
5. **Noller H.F.** Ribosomal RNA and translation Annu.Rev.Biochem. 60, 191–227 (1991)
6. **Olsen G.J., Woese C.** Ribosomal RNA: a key to phylogeny FASEB J. 7(1), 113–0, (1993)
7. **Van de Peer Y., Neefs J.M., De Rijk P., De Wachter R.** Reconstructing evolution from eukaryotic small-ribosomal subunit RNA sequences: calibration of the molecular clock J.Mol.Evolution 37(2), 221–232 (1993)
8. **Picking W.D., Odom O.W., Hardesty B.** Evidence for RNA in the peptidyl transferase center of *Escherichia coli* ribosomes as indicated by fluorescence Biochemistry 31(50), 12565–2570 (1992)
9. **Santer M., Dahlberg A.E.** Ribosomal RNA: an historical perspective In: Ribosomal RNA: structure, evolution, processing, and function in protein biosynthesis Zimmerman, R.A., Dahlberg, A. (eds.) Chapter 1. pp.3–19, CRC Press, Boca Ratin, 1996

3. МИТОХОНДРИИ

Клеточные органеллы, митохондрии и хлоропласты, уникальны тем, что имеют собственный "мини" геном. Тем не менее, они сильно зависят и от основного синтеза с ядерного генома. Например, митохондриальные рибосомы состоят из митохондриальных рРНК и р-белков, и последние почти все синтезируются с ядерного генома. Не все здесь изучено, но наблюдается большой прогресс, особенно при изучении митохондриальных рибосом из пекарских дрожжей *Streptomyces cerevisiae*.

Интересной особенностью митохондрий является то, что у них используются не все кодоны и, соответственно, всего 22–30 видов тРНК, причем каждая из тРНК одинаково читает все кодоны независимо от их третьей буквы, т.е. код, в основном, двухбуквенный. Это достигается, по-видимому, соответствующей модификацией нуклеотидов, входящих в антикодон и прилегающих к нему. Из особенностей трансляции в митохондриях интересно, например, то, что в мРНК митохондрий нет области, аналогичной Шайн-Дальгарно, для взаимодействия с рРНК. Есть также особенности устройства областей инициации и терминации трансляции, возможно, сохранившие эволюционно ранние относительно примитивные черты.

Геном митохондрий, например, человека — всего 16569 пар оснований, там всего 22 тРНК, т.е. код не вырожден, и некоторые кодоны отличаются от обычных. Геном хлоропластов гораздо больше (в 100 раз), чем у митохондрий.

3.1 РИБОСОМЫ МИТОХОНДРИЙ

Дальше пойдет речь только о митохондриальных рибосомах (м-рибосомах). Они обычно меньше, чем цитоплазматические. Самые маленькие — 55S — у многоклеточных животных. У грибов и растений рибосомы седиментируют с константой 70S, у одноклеточных жгутиковых — 80S. Однако, это не обязательно отражает величину молекулярной массы. Последняя у рибосом 55S не меньше, чем у бактериальных рибосом, вероятно, из-за большего относительного содержания белков.

В электронном микроскопе митохондриальные рибосомы напоминают обычные рибосомы, хотя есть и отличия.

3.2 рРНК МИТОХОНДРИЙ

В м-рибосомах животных и грибов отсутствует 5S-рРНК, а в м-рибосомах высших растений она присутствует. Определен сиквенс многих десятков митохондриальных рРНК. Они различаются и по длине и по первичной структуре. Самая короткая имеет всего 610 нуклеотидов, хотя некоторые важные черты вторичной структуры у них тоже наблюдаются. Сравнения показали, что, несмотря на разнообразие, все м-рРНК относятся к типу рРНК из эубактерий и ведут начало от предков, потомками которых сейчас являются бактерии и, возможно, не одни и те же в разных классах организмов. Но степень расхождения велика и это мешает точной идентификации родства. Возможно, что предки митохондрий растений не те, что у животных и грибов.

Геном м-рРНК довольно разнообразен у разных организмов.

3.3 РИБОСОМНЫЕ БЕЛКИ МИТОХОНДРИЙ

В митохондриях млекопитающих, например, 52 белка в большой субчастице и 33 - в малой. Интересно, что у одних и тех же организмов количество р-белков и их распределение по размерам одинаковы в цитоплазме и в митохондриях, так что не исключено, что это те же белки. По крайней мере, в нескольких случаях это доказано. Но в нескольких случаях доказано, что они разные. Кодируются м-р-белки, в основном, в ядре. Но несколько - кодируются и в самих митохондриях. Многие гены их найдены и клонированы. Их ищут, например, отжигом с праймерами, приготовленными на основании N-концевого анализа р-белков. Несколько белков очень похожи на р-белки *E.coli* (S12, L14).

Для транспорта из цитоплазмы на N-концах митохондриальных р-белков (во всяком случае, в их генах) имеются специальные лидерные последовательности. Но последовательности эти не очень стандартны и некоторые — довольно коротки (даже до 8 аминокислот), но иногда — и до 70. Они состоят из нейтральных и основных аминокислот, но в них нет кислых аминокислот.

В результате всей совокупности данных считают, что трансляционный аппарат митохондрий и хлоропластов напоминает соответствующий аппарат бактерий, что поддерживает идею о симбионтном происхождении этих органелл. Но некоторые р-белки митохондрий из, например, *S.cerevisiae* и *Neurospora crassa* не имеют аналогов в прокариотах. Количество белков в рибосомах митохондрий обычно больше, чем у бактерий.

ЛИТЕРАТУРА к пп. 3.1–3.5

1. *Lewin B.* Genes, Oxford University Press, Oxford, 1994 (Льюин, Б. Гены, М., Мир, 1987)
2. *Kitekawa M., Isono K.* The mitochondrial ribosomes *Biochimie* 73(6):813–825, 1991
3. *Matthews D.E., Hessler R.A., Denslow N.D., Edwards J.S., O'Brien T.W.* Protein composition of the bovine mitochondrial ribosome *J.Biol.Chem.* 257(15):8788–8794, 1982
4. *Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж.* Молекулярная биология клетки 1е изд. Мир М, 1986, или 2е изд

4. ТРАНСПОРТНАЯ РНК и РЕАКЦИЯ АМИНОАЦИЛИРОВАНИЯ

4.1 ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О СТРУКТУРЕ тРНК

тРНК — класс молекул РНК длиной от 74 до 93 нуклеотидов. На 1993 год было расшифровано около 1700 тРНК из более, чем 130 различных организмов. Некоторые сиквенсы сделаны по ДНК генома, многие — непосредственно. У ряда организмов исследованы все тРНК. Таким образом, появилась солидная основа для разных обобщений.

Первичная структура тРНК включает несколько взаимно комплементарных участков, и в результате все тРНК укладываются в очень сходную вторичную структуру “клеверного листа” (Правда, как обычно бывает, и здесь есть исключения — это тРНК некоторых митохондрий, у которых может полностью отсутствовать Т или D петля. Но это мы здесь обсуждать не будем).

Принята стандартная нумерация нуклеотидов в тРНК (Рис. 4.1). Цветом указаны участки, где число нуклеотидов может быть переменным и применяется вторичная нумерация. На 5'-конце в нескольких случаях имеется еще один нуклеотид под номером -1 (у некоторых тРНК^{His}). На этом конце всегда присутствует фосфат и N1 комплементарен N72 у всех элонгаторных тРНК. Некомплементарность в этом месте детерминирует инициаторные свойства тРНК^{Met} в прокариотах. На 3'-конце имеется рибоза, к которой и присоединяется соответствующая аминокислота.

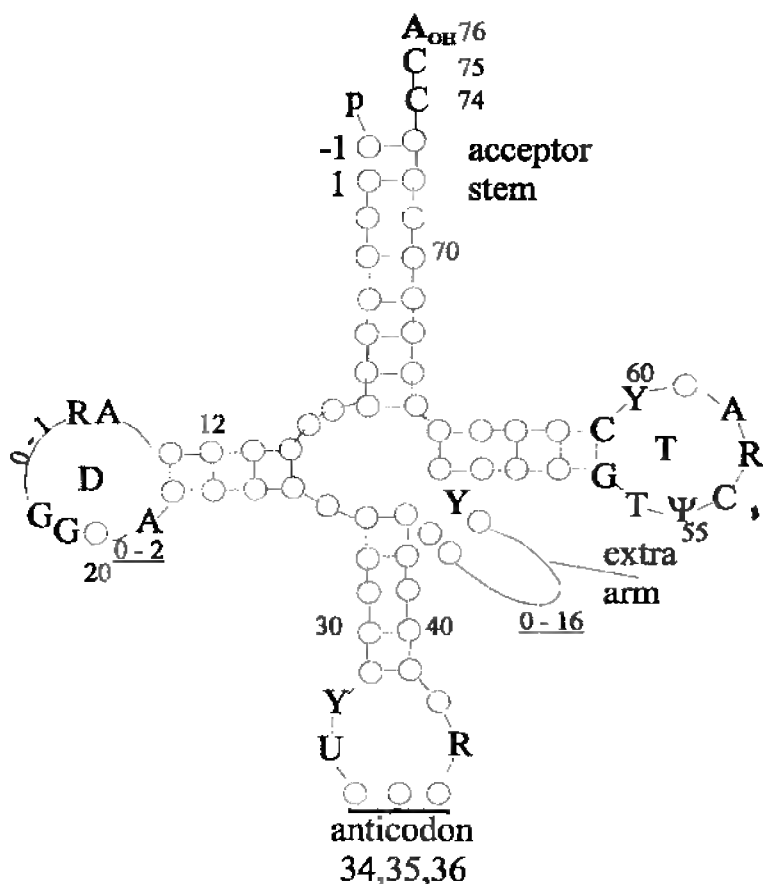


Рис. 4.1. тРНК — модель “клеверного листа”; указаны участки переменного размера и консервативные и полуконсервативные нуклеотиды (R — пурины, Y — пиримидины)

Таким образом, у молекулы тРНК имеются 4 “ветви” (“ARMS”): акцепторный стебель (“STEM”), D- и T-шпильки (там присутствуют модифицированные основания, ди гидроуридин и тимидин, соответственно), и антикодоновая шпилька, три нуклеотида в петле которой (34,35 и 36-й) являются антикодоном.

Антикодоновая и T-петли всегда неизменны по размерам, D-петля содержит от 4 до 10 нуклеотидов, притом постоянные G18–G19 перемещаются по петле. Переменная область между антикодоновой и T-петлями может иметь 4–5 нуклеотидов (тРНК класса I), или 10–23 (класс II, к которому относятся тРНК^{Leu}, тРНК^{Ser} и прокариотная тРНК^{Tyr}). Одновременно тРНК класса II содержат некомплементарные пурины в положении 13–22).

Многие нуклеотиды (до 15 нуклеотидов на молекулу) модифицированы по основаниям или по рибозе. Модификации происходят под действием специальных ферментов в ходе процессинга. Они очень разнообразны. Известно около 100 видов модифицированных оснований в 61 позиции тРНК. Их роль в общем случае не полностью ясна, возможно, общего назначения у них нет. Обычная их роль — стабилизация третичной структуры. Немодифицированные молекулы, полученные генно-инженерно, во многих случаях вполне функциональны, например, хорошо аминоацилируются. Но известны случаи, когда модифицированное основание является детерминантом аминокислотной или антикодоновой специфичности: в дрожжевой тРНК^{Asp} — важна модификация N37; замена CAU на LAU (L-лизидин) в антикодоне тРНК^{Met} делает ее изолейциновой. Лизидин имеется в антикодоне изолейциновой минорной тРНК E.coli (лизидин — модифицированный нуклеотид, в котором лизин за эпсилон-аминогруппу присоединен к 2-углероду цитозина). Еще пример: модификация U33 в тРНК^{Glu} E.coli является одним из основных детерминантов ее взаимодействия с аминоацил-тРНК синтетазой (немодифицированная тРНК имеет в 200 раз пониженное отношение k_{cat}/K_m).

В молекулу тРНК входит 16 консервативных нуклеотидов и несколько (еще 5) полуконсервативных (только пурины или только пиримидины) Они разбросаны по молекуле (показаны на Рис. 4.1). Три из них, C74, C75 и A76, находятся на 3'-конце и у некоторых видов тРНК присоединяются к молекуле при процессинге с помощью специального фермента (нуклеотидилтрансферазы). Остальные нуклеотиды, кроме этих 21 — могут быть любые в разных тРНК, хотя распределение их не вполне случайно.

Клеверный лист тРНК свернут в компактную глобулу (Рис. 4.2)

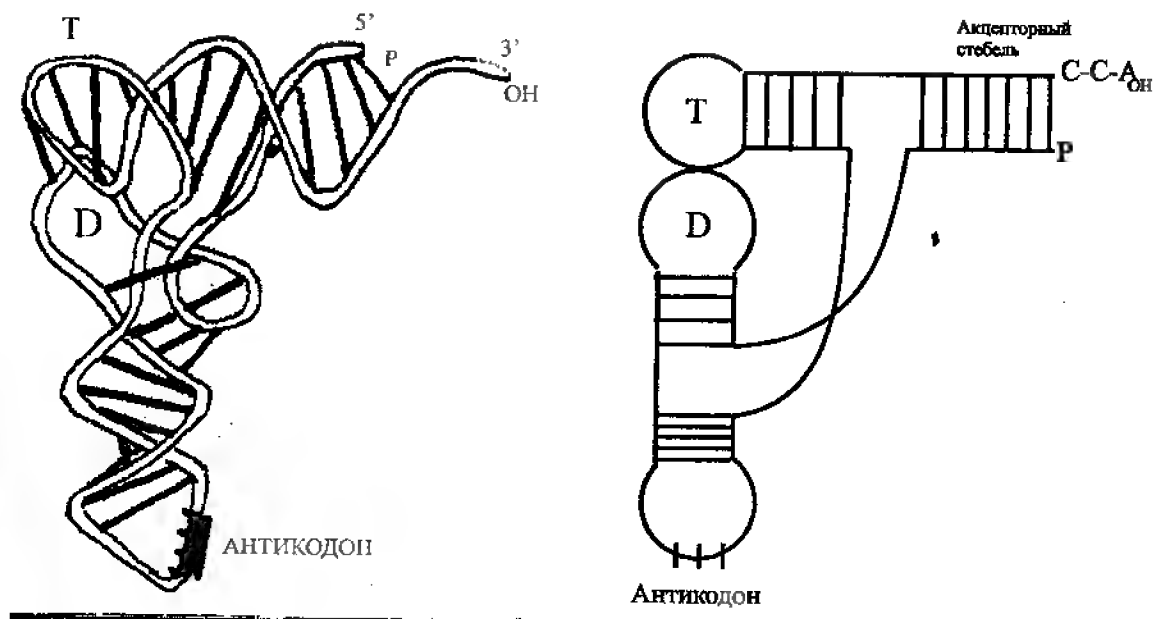


Рис. 4.2. Пространственная форма (L-форма) молекулы тРНК

Глобулу скрепляют несколько нестандартных водородных связей, некоторые с участием молекул воды и ионов Mg^{2+} . Таких связей 9. В них участвуют, в основном, консервативные нуклеотиды. Таким образом, вероятно, обеспечивается консервативность вторичной структуры. Связаны нуклеотиды попарно, а в двух случаях по три (Рис. 4.3)

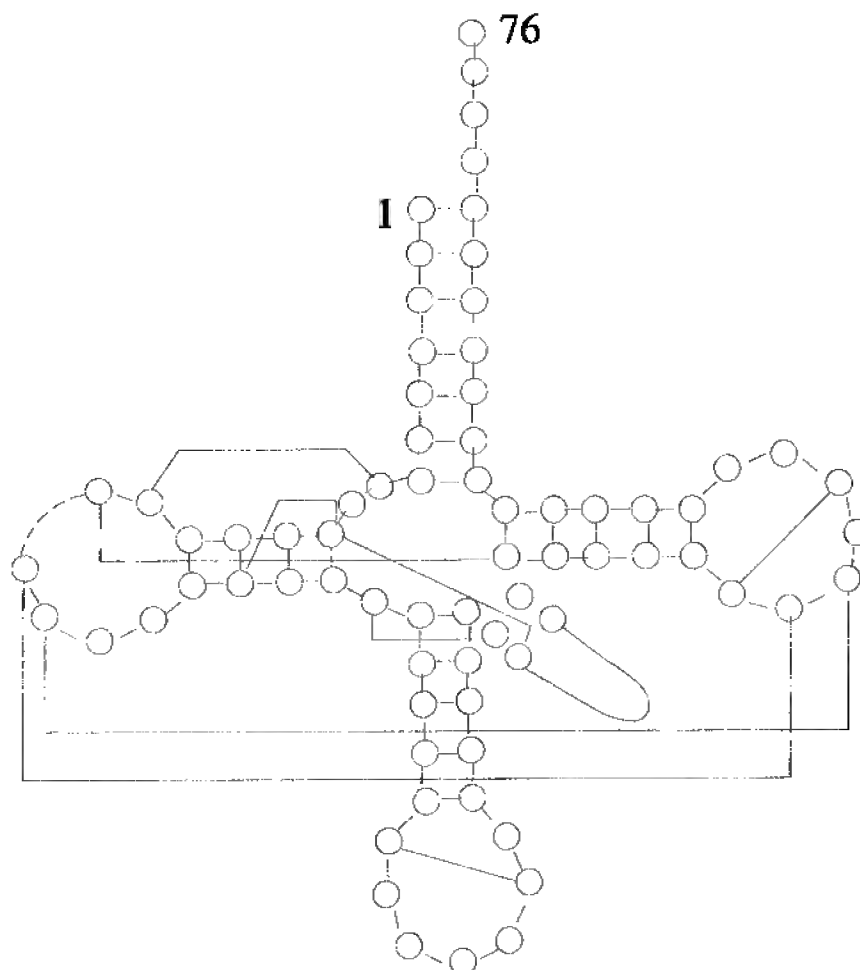


Рис. 4.3 . Третичные взаимодействия в молекуле тРНК.

Вторичные и третичные структуры у подавляющего большинства молекул тРНК сходны настолько, что, например, ферменты процессинга точно вырезают тРНК из длинного предшественника, ориентируясь, в основном, на вторичную и третичную, а не на первичную структуру.

4.2 ЭКСПРЕССИЯ В КЛЕТКАХ И ПРОЦЕССИНГ *m*РНК

Гены тРНК разбросаны по геному и частично собраны в кластеры.

При созревании 5'-конец тРНК от длинного предшественника отщепляет РНКазы Р. Это очень интересный и необычный фермент. В *E. coli* РНКазы Р состоит из 119 аминокислот и, примерно, 400 нуклеотидов. Сама по себе РНКовая часть РНКазы Р и без белка является катализатором и точно работает даже *in vitro*. Белок нужен только как электростатический экран. По РНК РНКазы Р можно построить филогенетич. древо, поскольку этот фермент существует у всех известных организмов. Но в эукариотной РНКазе Р без белка РНК каталитических свойств не проявляет.

Созревание тРНК на 3'-конце не до конца понятно. Очевидно, должна работать эндо-, а затем, может быть, экзонуклеаза. Таких нуклеаз в клетках много, например, в *E. coli* имеются РНКазы II, D, BN, T, RN. Но любая из них, и даже несколько, могут без последствий в клетках отсутствовать. Почему-то они взаимозаменяемы.

Я уже упоминал, что в митохондриях некоторых организмов (в нематодах — аскаридах и *C.elegans*) вторичная структура тРНК сильно отличается от стандартной. Например, у молекулы отсутствует Т или D петля. Мне не известно значение и влияние этих аномалий.

4.3 АМИНОАЦИЛ-тРНК СИНТЕТАЗЫ

Главная функция тРНК — трансляция генетического кода. Аминокислот, как известно, 20, значащих кодонов 61. Каждой аминокислоте соответствует от 1 (Met, Trp) до 6 (Ser) кодонов. тРНК своим антикодоном может узнавать от одного до 4 кодонов. Соответственно, каждой аминокислоте соответствует от одной до 6 тРНК. Первичные структуры тРНК одинаковой аминокислотной специфичности могут сильно отличаться друг от друга. Тем не менее, неизменно, аминокислоту к ним присоединяет только одна синтетаза, которая узнает их всех. Мало того, нередко синтетаза из одного организма, например, из дрожжей, может аминоацилировать очень далекую по первичной структуре тРНК из эволюционно далекого организма (*E.coli*). Я не буду здесь касаться свойств синтетаз. Скажу только, что, как ни удивительно, эти ферменты, имеющие одинаковое назначение, совершенно различны по всем свойствам: по молекулярной массе, первичной и четвертичной структурам (возможны от 1 до 4 субъединиц). Молекулярная масса от 51 (Cys) до 384 кДа (Ala), длина субъединицы от 334 (Trp) до 1112 (Phe) аминокислот. Высказывалось предположение, что синтетазы возникли в эволюции независимо друг от друга. Но в последние годы, когда накопились данные по рентгеноструктурному анализу ARSаз и их сиквенсу, были найдены общие так называемые “мотивы” в центрах связывания АТФ и ССА-конца тРНК. В зависимости от этого они разбиты на 2 класса.

В I классе два коротких, но консервативных участка “HIGH” и “KMSKS” (однобуквенные обозначения аминокислот, см. в Таблице генетического кода), входящих в т.н. “ROSSMAN FOLD”, мотив из 5 спиральных участков, в котором связывается АТФ и который имеется у многих АТФ-связывающих белков. В классе II - три мотива, которые непросто увидеть (только с помощью компьютера), т.к. там встречается множество замен сходных аминокислот, да и расположены они на разных расстояниях друг от друга. Интересно, что мотивы одного класса исключают мотивы другого. И еще отличие: ARSазы одного класса присоединяются с одной стороны L-образной молекулы тРНК и аминоацилируют ее по 2'-, гидроксилу концевой рибозы, а другого — присоединяются с другой стороны и аминоацилируют по 3'-гидроксилу.

Многие ARSазы *E.coli* и *B.subtilis* взаимозаменяемы. Гены их сгруппированы в 3 кластера. Регулирование их происходит достаточно сложно, частично под воздействием деацилированной тРНК.

Семейство ARSas представляет собой прекрасную модель для изучения множества вопросов энзимологии и молекулярной биологии. Кроме того, накапливаются сведения о том, что помимо главной задачи, аминоацилирования тРНК, ARSазы в клетках выполняют много и других функций (см. обзор, Martinis et al, 1999), например, некоторые выполняют роль регулятора транскрипции и трансляции, ко-фактора сплайсинга мРНК и т.д.

Как работает aa-тРНК синтетаза? Валовая формула реакции выглядит так:



Аминокислота оказывается связанной через карбоксил сложноэфирной связью с 2' или 3'-углеродом 3'-концевой рибозы тРНК.

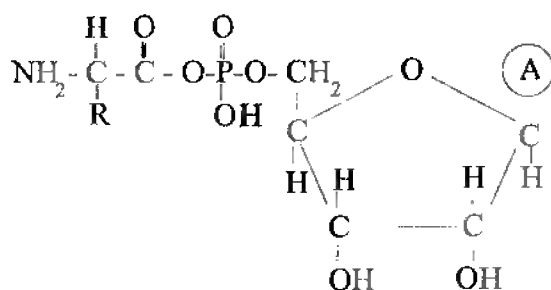
Отщепление пиррофосфата понижает свободную энергию АТФ на 7 ккал/моль. Эта энергия явно переходит к аминокацил-тРНК, поскольку реакция аминокацилирования обычно не идет до конца, и устанавливается равновесие. Т.е. свободная энергия системы почти не понижается. Обратимость проявляется в так называемом “обмене пиррофосфата”, который имеет место в ходе реакции. Меченый пиррофосфат в растворе быстро обменивается с АТФ, если отсутствуют пиррофосфатазы, т. е. если фермент хорошо очищен.

Пиррофосфат тоже содержит запас свободной энергии, и быстро гидролизуется почти вездесущими пиррофосфатазами до ортофосфата. Обратная реакция становится невозможной, и аминокацилирование идет до конца. Таким образом, сложноэфирная связь в аминокацил-тРНК макроэргична, с запасом свободной энергии порядка 7 ккал/моль. Соответственно, она довольно неустойчива, особенно в щелочной области рН, гидролизуясь даже при рН 8 за десятки минут (или даже за минуты) при комнатной температуре.

Показанная выше реакция протекает на самом деле в два этапа. Первый — образование аминокациладенилата:



Аминокислота в аминокациладенилате связывается фосфоангидридной связью через карбоксил на фосфат АМР:



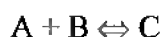
и остается связанной с ферментом. Если в среде нет соответствующей тРНК, реакция останавливается. При добавлении тРНК, последняя связывается с комплексом, и быстро протекает второй этап: аминокислота переходит на тРНК, а АМР выходит из комплекса в раствор.

5 ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ тРНК С АМИНОАЦИЛ-тРНК СИНТЕТАЗАМИ

Характер аминокислотного остатка на тРНК не играет существенной роли при дальнейшей трансляции, т. е. при реакции на рибосоме. Любая ошибка при аминокислотировании будет поэтому иметь следствием ошибку в первичной структуре белка. Очевидно, что аминокислотирование должно, по определению, происходить с большой точностью (ошибка — сотые процента). Эта точность должна обеспечиваться соответствующей точностью узнавания синтетазой аминокислоты — с одной стороны и тРНК — с другой. Как это происходит — я хочу вам, хотя бы грубо приблизительно, рассказать. Для этого я прерву здесь изложение основной темы. Мне этот вопрос кажется очень важным, поскольку взаимное узнавание лежит в основе всех явлений жизни.

5.1 ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ МОЛЕКУЛ ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ

На каких принципах основано взаимное узнавание органических молекул и как его можно количественно описать? Пусть взаимодействуют два объекта, А и В, образуя комплекс С. Это взаимодействие, по крайней мере, теоретически, всегда обратимо:



Если энергия диссоциации сравнима с энергией теплового движения (около 600 кал/моль при комнатной температуре), диссоциация легко наблюдаема. В любом случае реакция может быть охарактеризована константой ассоциации K_a :

$$K_a = [C]/[A][B]$$

и, по определению:

$$K_a = \exp(-\Delta G^\circ/RT), \text{ или } \Delta G^\circ = -RT \ln K_a;$$

ΔG° — свободная энергия Гиббса (“стандартная”, если концентрации выражены в молях/литр). Она имеет размерность энергии и характеризует взаимодействие количественно. Особенностью биологических объектов является то, что они большие и сложные, и на поверхностях имеется обычно не один, а несколько “центров”, или “детерминантов”, каждый из которых взаимодействует со своим комплементом у партнера. ΔG° всех взаимодействующих центров при этом складываются:

$$\Delta G^\circ_{\text{сум}} = \sum \Delta G^\circ_i$$

Природа сил взаимодействия довольно разнообразна: это водородные связи, вандерваальсовы силы, электростатические взаимодействия, и очень важные в водных средах гидрофобные взаимодействия. Правда, не так легко, а часто и невозможно вычленить их. Энергии взаимодействия каждой пары таких групп часто невелики по сравнению с энергией теплового движения. Но если таких пар много, суммарная энергия их взаимодействия может достигать и даже превосходить энергию прочных химических связей.

Однако, остается существенное отличие от химических взаимодействий, а именно, невысокий активационный барьер, гораздо более низкий, чем для химической связи, так как суммарная связь разрывается не одновременно.

Заметим, что если свободные энергии складываются, константы равновесия перемножаются и соответствующая K_a экспоненциально растет.

Поскольку RT — энергия теплового движения при комн. т-ре равна 600 кал/моль, то:

$K_a = 10^{-1}$ соответствует $\Delta G^\circ = 1400$ кал/моль;

$K_a = 10^{-2}$ соответствует $\Delta G^\circ = 2800$ кал/моль;

$K_a = 10^{-4}$ соответствует $\Delta G^\circ = 5600$ кал/моль, и т.д.

Так можно обеспечить любое сродство.

Таким образом, особенности взаимодействия достаточно больших и сложных молекул:

1) Поскольку центров взаимодействия на больших объектах может быть много, $\Delta G^\circ_{\text{сум}}$ может быть очень велика, вполне сравнима с энергией химической связи и даже может превосходить ее.

2) Даже при огромной K_a энергия активации диссоциации всегда невелика, поскольку связи могут диссоциировать не одновременно. Поэтому даже при большой K_a скорости обмена компонентов комплекса могут быть достаточно велики. У химической же связи активационный барьер почти всегда достаточно высок и, в общем, пропорционален энергии связи.

3) В нем заложены возможности узнавания (селективного взаимодействия), о чем речь пойдет позже.

Свободная энергия состоит, как известно, из двух частей, энтальпийной и энтропийной:

$$\Delta G^\circ = \Delta E^\circ - T\Delta S^\circ$$

где ΔE° — суммарная энтальпия взаимодействия всех комплементарных пар, а ΔS° — изменение энтропии (т.е. вероятности данного состояния) при взаимодействии. Изменение вероятности зависит от изменения количества степеней свободы системы. Точнее, $\Delta S^\circ = R \ln Q$, где Q — статистическая сумма данного состояния. В эту последнюю входят члены, зависящие от гидратации, подвижности молекул воды, и т.д. Она поддается вычислению только для идеального газа. Но, тем не менее, рассмотрение вопроса в общем виде позволяет понять некоторые важные моменты. И я хочу обратить ваше внимание на некоторые из них.

1) Как суммируются свободные энергии? Пусть А адсорбируется на некоторый достаточно большой объект С. Трансляционные и вращательные степени свободы А при этом теряются. Вклад в свободную энергию трех трансляционных степеней свободы при концентрации 1 М, молекулярной массе порядка 10^3 Да и 20°C составляет 38 кДж/моль и слабо (логарифмически) зависит от массы. От трех вращательных — вклад тоже не мал и составляет порядка 30 кДж/моль. Правда, эти вклады частично компенсируются увеличением момента инерции комплекса и вращением вокруг вновь образовавшейся связи. Вибрации мало возбуждены при комнатной температуре и дают небольшой вклад. Но, в общем, уменьшение энтропийного члена все же будет очень велико — порядка 40 кДж/моль, или 10 ккал/моль! Очевидно, что эта величина, во всяком случае, будет вычитаться из свободной энергии взаимодействия А с С, многократно уменьшая K_a .

Теперь представим себе, что мы хотим измерить ΔG° вклада части В молекулы АВ при адсорбции ее на С. Эта величина ни в коем случае не будет равна ΔG° адсорбции отдельной молекулы В на С, а будет намного превосходить ее (по абсолютной величине). По причинам, о которых я уже говорил, разница может составлять до 10 ккал/моль! Но вполне разумно определить вклад В в свободную энергию связывания АВ на С как разницу между ΔG° адсорбции А на С и АВ на С, потому что в АВ трансляционные и ротационные степени свободы В уже были потеряны.

2) Выше разговор шел об равновесном взаимодействии биологических объектов. Но к ферментативной кинетике приложимы те же соображения. Нужно только понимать, как взаимодействие субстрата с ферментом связано с катализом.

Действительно, скорость химической реакции, если она достаточно мала (не ограничивается диффузией), определяется вероятностью перехода через активационный барьер.

Заметим, что на вершине активационного барьера субстрат(ы) изменяют конформацию, образуя переходный комплекс.

Как фермент может понижать активационный барьер? Очевидно, взаимодействуя с субстратами, и именно на вершине барьера. Тогда увеличение скорости реакции будет определяться величиной этого понижения, т. е. величиной “константы равновесия” субстрата (в переходном состоянии) с ферментом.

Известно, что субстраты образуют сначала так называемый “комплекс Михаэлиса” с субстратными центрами фермента; константы диссоциации этих комплексов обозначается K_m . Лишь затем они образуют переходный комплекс и вступают в реакцию с образованием продуктов. Но структура субстратов обязательно отличается от их же структуры в переходном комплексе и, естественно, взаимодействие в комплексе Михаэлиса не может быть таким же сильным, как в переходном состоянии. Наибольшая скорость ферментативной реакции будет тогда, когда фермент слабо взаимодействует с исходной формой субстрата, но максимально — с переходным его состоянием. Это подтверждено многочисленными экспериментальными данными (подробно этот вопрос рассматривает Э. Фершт в учебнике “Структура и механизм действия ферментов”). Вопрос о скорости ферментативного катализа сводится, таким образом, к вопросу о квазиравновесном взаимодействии субстратов в переходном состоянии с субстратным центром фермента и о понижении в результате этого взаимодействия активационного барьера реакции (Рис. 5.1) А к последнему применимы те же рассуждения, что и к равновесному взаимодействию биологических молекул.

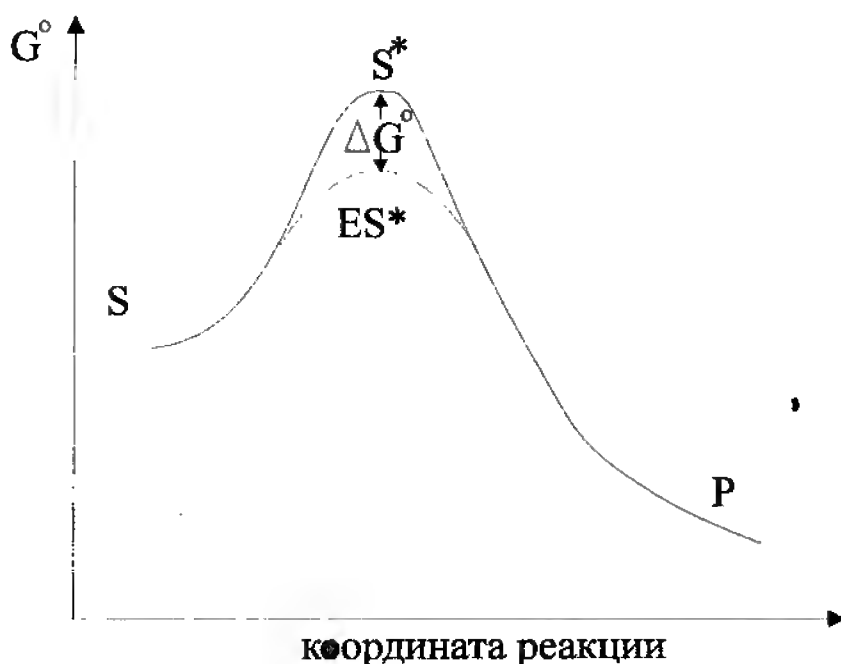


Рис. 5.1 Пояснение на энергетической диаграмме роли понижения активационного барьера при ферментативной реакции. S — исходный субстрат, S* — его переходное состояние, ES* — переходное состояние фермент-субстратного комплекса, P — продукт.

5.2 СЕЛЕКТИВНОСТЬ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

Говоря о селективности, мы имеем в виду, что в системе имеется несколько (хотя бы два) похожих объекта, A_p и A_n (например, два типа субстратов данного фермента или два репрессора), “правильный” и “неправильный”, которые данный субъект, B (фермент, оператор и т.д.) должен отличить друг от друга.

Введем понятие “вероятность ошибки”, f , как отношение концентраций неправильного C_n и правильного C_p комплексов:

$$\begin{aligned} C_p &= K_p [A_p][B] & f &= (K_n/K_p)([A_n]/[A_p]) \\ C_n &= K_n [A_n][B] \end{aligned}$$

и обозначим $f_0 = K_n/K_p$; эта величина характеризует селективность системы как таковой. Реальная ошибка есть f_0 (имманентная характеристика), умноженное на отношение концентраций объектов, которое может быть благоприятным и неблагоприятным.

Очевидно, что отношение констант, по определению, есть

$$f_0 = K_n/K_p = \exp\{(-\Delta G_n^\circ + \Delta G_p^\circ)/RT\}$$

Что следует? Для селективности важна не энергия взаимодействия, а только разность этих энергий, $\Delta\Delta G$, у правильного и неправильного объектов. Эта разность - следствие того, что у неправильного объекта отсутствует одна или несколько комплементарных субъекту взаимодействующих групп. Или что такие группы на контактных поверхностях смещены относительно друг друга, а сами поверхности достаточно жесткие и силы связывания короткодействующие (такowymi являются все силы, кроме электростатических). Вклад таких групп и определяет селективность отбора. Взаимодействующие группы в макромолекулярных комплексах называют иногда “recognition determinants” а те, которые определяют селективность, — “identity determinants”. Все они, в принципе, могут быть и отрицательными (об этом — ниже). Зная, какова обычная свободная энергия взаимодействия групп, определяющих селективность, мы можем априори судить о предельно возможной селективности, скажем, о наименьшем возможном выходе реакции фермента с неправильным субстратом. Если эта свободная энергия, например, 1400 кал/моль, (и концентрации субстратов одинаковы), будем иметь 10 % ошибок $\{f_0 = \exp(-1400/600)\}$, если 2800—1 %, и т.д. Энзимологи, не очень сведущие в термодинамике, высказывали предположение о том, что это рассмотрение в случае ферментативной реакции имеет ограниченное значение, поскольку речь шла здесь только о равновесном взаимодействии, а для ферментативной реакции “важна кинетика”. Кроме того, высказывали предположения о том, что, поскольку субстрат сначала образует комплекс Михаэлиса и лишь затем вступает в реакцию, селекция может осуществляться на обеих стадиях. На самом же деле рассуждения, приведенные выше, универсальны. Когда фермент-субстратный комплекс находится на максимуме потенциальной кривой, т. е. на вершине активационного барьера, который понижается за счет свободной энергии взаимодействия фермента с субстратом, то именно разницей этого понижения у правильного и неправильного субстратов определяется отношение скоростей катализа. И, рассуждая точно так же, как и раньше, приходим к заключению, что более сильное взаимодействие правильного субстрата в комплексе Михаэлиса по сравнению с неправильным, хотя и увеличивает селективность, но соответственно увеличивает и разницу высоты преодолеваемых активационных барьеров в пользу неправильного субстрата. Таким образом, свободная энергия селекции, оставаясь той же самой, просто распределяется между первым и вторым этапами реакции; $\Delta\Delta G^\circ$ определяет изменение $k_{\max}/K_m$ фермента по отношению к конкурирующим субстратам, и выгоды от двухстадийности процесса не может быть.

1. *Page M.I.* The energetics of neighbouring group participation *Chem.soc.rev.* 2, 295–323 (1972)
2. *Феррум Э.* Структура и механизм действия ферментов Мир, М., 1980
3. *Jenks W.P.* *Adv.Enzymol.* 43, 219–410 (1975)
4. *Dill K.A.* Additivity principles in biochemistry *J.Biol.Chem.* 272(2), 701–704 (1997)
5. *Page M.I.* The specificity of enzyme-substrate interactions In: Accuracy in molecular processes, *Kirkwood T.B.L., Rosenberger R.F., Galas D.J.* (eds.), pp.37–66. Chapman & Hall, New York, 1986
6. *Page M.I.* Entropy, binding energy, and enzymic catalysis. *Angew.Chemie Intern.Edition* 16, 449–459 (1977)

5.3 УЗНАВАНИЕ АМИНОКИСЛОТ АМИНОАЦИЛ-тРНК СИНТЕТАЗОЙ

Если мы обратимся к первой части задачи аминоксил-тРНК синтетазы, к узнаванию ею аминокислоты, то сразу столкнемся с затруднениями. Дело в том, что некоторые из аминокислот очень мало отличаются друг от друга. Например, пары глицин — аланин и валин — изолейцин отличаются только одной метиленовой группой (Рис. 5.2).

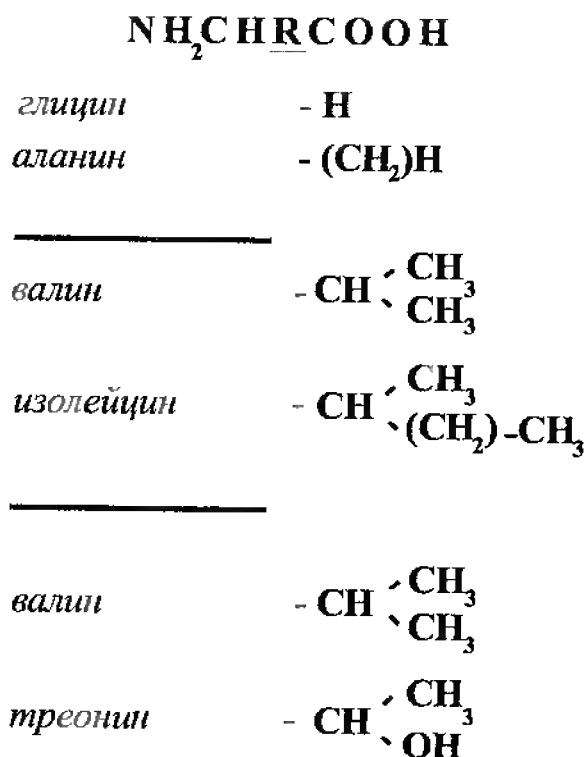


Рис. 5.2. Пары аминокислот, мало различающихся между собой.

А мы знаем, что такая группа образует только гидрофобную связь, которая, как установлено специальными экспериментами и теоретическими расчетами, никак не может давать более 3 ккал/моль. Т.е. аланил-тРНК синтетаза будет аминокислотилировать валиновую тРНК глицином, а изолейцил-тРНК синтетаза аминокислотилировать изолейцил-тРНК валином не менее, чем в 0,5 % случаев, что, как мы понимаем, недопустимо. Тем более, что и соотношение концентраций в случае изолейцил-тРНК синтетазы неблагоприятно (валина в цитоплазме *E.coli* в 6 раз больше, чем изолейцина). Не будем забывать также об участии в конкуренции и других аминокислот, хотя условия для их отбраковки очевидно, гораздо более благоприятные.

Та же трудность будет у валил-тРНК синтетазы по отношению к треонину (Рис. 5.2), поскольку у последнего метильной группы нет, а компонента к OH-группе у фермента не предусмотрено.

Между прочим, обратные случаи (отбраковка изолейцина валиновым ферментом и аланина — глициновым, надо рассматривать иначе. Ферменты относительно легко отвергают субстрат, у которого имеется лишняя метиленовая группа, за счет стерических ограничений. Эти “лишняя” группа просто не влезает в “ямку” для субстрата. Последняя должна раздвинуться для того, чтобы в нее поместился на достаточное для реакции время увеличенный субстрат. Жесткость белковой глобулы велика, и такой процесс требует свободной энергии порядка 7 ккал/моль, т. е. f_0 получается 1/100000.

Действительно, все эти расчеты оправдываются на первой стадии аминокислотирования, при образовании аминокислотаденилата. Но при последующем присоединении тРНК к комплексу большая часть ошибочно образовавшегося аминокислотаденилата распадается и ошибочного аминокислотирования тРНК почти не происходит. Ошибки конечного продукта, таким образом, оказываются очень (достаточно) малыми. Это оказалось загадкой.

В 1974 г. Хопфилд предложил схему решения задачи. Идея состоит в том, что, если ферментативная реакция сопряжена с расходом макроэрга, термодинамика не препятствует повторной селекции. Реакция происходит в два этапа. Сначала образуется промежуточный продукт с количеством ошибок, определяемым $\Delta\Delta G^\circ$. Продукт этот остается в комплексе с ферментом и может быть достаточно макроэргичным за счет сопряженного распада молекулы макроэрга. На втором этапе имеет место реакционная “вилка”: промежуточный продукт может превратиться в конечный, или распасться, снова превратившись в исходный субстрат (это возможно именно потому, что промежуточный продукт макроэргичен). Фермент должен быть устроен так, чтобы вероятность превращения в окончательный продукт была велика по отношению к распаду для “правильного” промежуточного продукта, и, наоборот — для “неправильного”. Это, естественно, может быть устроено за счет повторного использования $\Delta\Delta G^\circ$, так что, в пределе, $\Delta\Delta G^\circ$ суммарной реакции удваивается, а суммарная селективность возводится в квадрат. Такой механизм называют “кинетической коррекцией” (“kinetic proofreading”).

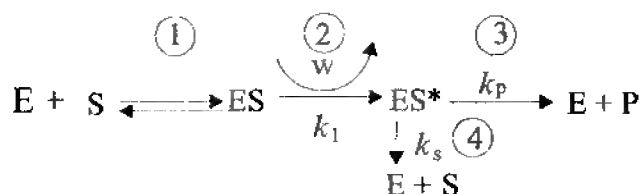


Рис. 5.3 Схема кинетической коррекции по Хопфилду. W — макроэрг.

Дальнейшее теоретическое рассмотрение, однако, показало, что механизм коррекции может работать только при условии, если вероятность распада правильного промежуточного продукта на втором этапе селекции, хотя и малая, не будет равна нулю. И чем больше вероятность этого распада, тем больше макроэрга “пропадает” непродуктивно, но тем больше и степень использования $\Delta\Delta G^\circ$ на этом этапе. То есть наибольшая точность на втором этапе не достигает f_0 , а в $S/(S-1)$ раз хуже этой величины (где S — расход макроэрга на один акт превращения правильного субстрата. Грубо говоря, если, скажем, 10 % правильного промежуточного продукта распадается (перерасход макроэрга будет около 10 %, т. е. 1,1 моля его будет расходоваться для образования 1 моля окончательного продукта), минимально возможная ошибка будет $10 f_0^2$, при перерасходе 50 % ошибка будет $2 f_0^2$, и т.д. Множитель при f_0 будет близок к 1 только при очень большой непроизводительной затрате макроэрга. Поэтому реально на втором этапе точность коррекции будет всегда меньше, чем f_0 , а общая поэтому меньше f_0^2 .

Если “правильного” субстрата в систему вообще не дать, а дать только неправильный, то из-за большой вероятности распада неправильного промежуточного продукта, расход макроэрга будет очень велик, десятки и сотни молей на моль (неправильного) окончательного

продукта. Это отношение и есть количественный показатель степени отбора на этапе кинетической коррекции и наличие перерасхода макроэрга при реакции с неправильным субстратом служит надежным признаком существования этого этапа.

Эксперименты полностью подтвердили все эти предположения. Во-первых, как мы видим, все признаки возможного пруфридинга при аминокацилировании имеются, и аминокациладенилат, макроэргичный и связанный с ферментом, может служить как раз промежуточным продуктом. Механизм был обнаружен у разных аминокацил-тРНК синтетаз, и именно у тех, которым нужно “опасаться конкурентов”. Сотни молекул АТР распадаются на каждую образовавшуюся молекулу неправильно аминокацилированной тРНК, если в растворе нет правильной аминокислоты. Наконец, интересно, что функция и устройство для коррекции относительно независимы от основной ферментативной функции, и коррекцию иногда удается отключить (например, в мутантных синтетазах, или за счет химической обработки фермента, добавления спирта в среду и пр.).

Механизмы распада промежуточного продукта бывают очень интересными и специфически настроенными на природного конкурента. Например, у метионина таким конкурентом является гомоцистеин (это соединение, похожее на метионин но с -SH-группой вместо -SCH₃), промежуточный продукт метаболизма, которого в цитоплазме много (около 50 мкМ, столько же, сколько и метионина).

Другой интересный пример — механизм отстройки изолейцил-тРНК синтетазы от валина. На первый взгляд, он не согласуется с теорией, поскольку на первом этапе избирательность невелика, а на втором — гораздо выше, хотя по вышеупомянутой теории он должен быть значительно ниже. Оказалось, что на втором этапе используются стерический механизм отбора (а не сравнительно маленькая ΔG метиленовой группы): он устроен так, что именно маленький валин легко отщепляется от аденилата и вываливается в раствор, а большой Ile должен для этого раздвинуть белковый каркас, что требует активации, как мы знаем, 7 ккал/моль (механизм был назван “молекулярным ситом”).

Механизм кинетической коррекции работает также при репликации, транскрипции, и, о чем я еще скажу, даже и при трансляции.

5.4 УЗНАВАНИЕ тРНК АМИНОАЦИЛ-тРНК СИНТЕАЗОЙ

Для такого узнавания, как кажется, не должно быть особых затруднений, поскольку детерминантов на тРНК может быть много.

Третичные структуры тРНК мало отличимы. Несомненно, на молекулах тРНК должны быть участки первичной структуры, определяющие их родство к синтетазе вообще (recognition regions) и к специфичной синтетазе, в частности (identity determinants). Если подумать, то очевидно, что, поскольку на самом деле безошибочное аминокацилирование есть результат конкуренции внутри клетки за данную тРНК между разными синтетазами, identity determinants могут быть не только положительными, но и отрицательными, т. е. могут отталкивать “опасную” синтетазу от тРНК. Такие случаи имеют место в реальности.

Простейшее предположение состояло в том, что именно антикодон тРНК есть детерминант. Но вскоре поняли, что это не так, или не всегда так. Поскольку одна и та же синтетаз узнает несколько тРНК одной специфичности, а антикодоны у них могут отличаться иногда даже не по одной, а по двум и даже по трем позициям, априори ясно, что антикодон не может быть во всех случаях детерминантом, во всяком случае, единственным.

Можно сравнивать первичные структуры тРНК одинаковой специфичности из одного и разных организмов, взаимодействующих с одной и той же синтетазой, и, наоборот, сходных по структуре, но взаимодействующих с разными синтетазами. Такие компьютерные программы для поиска детерминантов делали неоднократно, но решить задачу в общем случае не удалось, хотя иногда получали полезные указания для дальнейшего экспериментального поиска.

5.4.1 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДЕТЕРМИНАНТОВ АМИНОАЦИЛИ-тРНК СИНТЕТАЗЫ НА МОЛЕКУЛЕ тРНК

Сравнение первичных структур может указать на подозреваемый нуклеотид. Если при замене его прекращается или значительно замедляется аминоацилирование, или появляется ацилирование неправильной аминокислотой, то это говорит о роли данного нуклеотида как детерминанта данной синтетазы. Но является ли он *recognition* или *identity* элементом - неизвестно. Прекращение аминоацилирования может быть просто следствием нарушения третичной структуры тРНК. Даже если замена вызывает изменение специфичности, то выводы опять-таки неоднозначны. Возможно, что мы не вводим новый положительный детерминант, а убиваем отрицательный. Поэтому на следующем этапе проверки подозреваемый нуклеотид переносят в молекулу тРНК другой специфичности. Если это вызывает соответствующее изменение этой специфичности, получаем сильное доказательство того, что переносимый участок - *identity element* В некоторых случаях возможен также перенос подозреваемого участка в короткие двунитевые рибоолигонуклеотиды (*mini- and microhelices*), которые становятся субстратами ARSaz. Об этом позже.

Очевидно, что детерминантов, как *recognition*, так и *identity*, может быть несколько, и они могут действовать вместе. Так что, найдя один элемент, существенный для аминоацилирования, надо еще проверить, нет ли второго, третьего, и т.д. Все эти соображения полностью подтверждаются экспериментом. Детерминантами, действительно, оказались отдельные нуклеотиды (или комплементарные пары).

Специфичность определяется двумя основными способами: *in vivo* и *in vitro*. В последнем случае измеряют количественно скорость аминоацилирования данной синтетазой изучаемой тРНК. Количественная характеристика скорости каталитической реакции — отношение k_{cat}/K_m . Это отношение определяет свободную энергию взаимодействия тРНК с синтетазой. Интересно, что K_m у синтетаз довольно велика (порядка 10^{-5} М), так что в клетке концентрация субстрата меньше K_m .

Преимущество способа *in vitro* - количественность и огромная чувствительность. Уже говорилось, что можно наблюдать реакцию в 10^5 – 10^6 раз более медленную, чем реакция с нормальным субстратом. Пониженная скорость аминоацилирования модифицированной тРНК показывает, что какого-то детерминанта не хватает, или имеется отрицательный детерминант.

Способ *in vivo* основан на изучении супрессорных свойств заданной тРНК.

5.4.2 СУПРЕССИЯ. АМИНОКИСЛОТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ тРНК ПРИ СУПРЕССИИ

Супрессией можно назвать подавление фенотипического проявления любой мутации, в т. ч. путем замены нуклеотидов и сдвига рамки считывания. Но здесь мы будем обозначать этим термином только подавление эффекта нонсенс-мутаций. Если в результате мутации в структурном гене появился нонсенс-кодон, *amber*, *ochre* или *opal*, то в этом месте происходит терминация и вместо полной молекулы синтезируется обрывок, естественно, не функционирующий. Но такая мутация является супрессируемой. Т.е. в клетке все нонсенс-мутации данного вида подавляются в той или иной степени, если клетка является "супрессорной", т. е. в ней имеется специальная супрессорная тРНК, антикодон которой узнает данный нонсенс-триплет.

В результате селекции клеток на супрессорные свойства, были обнаружены супрессорные тРНК разной специфичности, но все они происходили только из таких тРНК, антикодоны которых отличались от супрессорной только одной "буквой". Но, в принципе, тРНК любой специфичности может стать супрессорной, если заменить весь ее антикодон. В современных экспериментах весь ген тРНК можно синтезировать химически и ввести в плазмиду под промотор. Другой способ — размножить ее с комплементарного дезоксиолигонуклеотида с помощью РНК-полимеразы фага Т7. Правда, в последнем случае в ней заведомо отсутствуют модифицированные нуклеотиды.

Возникает естественный вопрос: почему супрессорные клетки вообще жизнеспособны и в них явным образом не нарушается терминация? В дальнейшем мы увидим, что для эффективной терминации важен контекст, в котором расположен терминирующий кодон. Он вокруг нонсенс-мутации отсутствует. Поэтому супрессорная тРНК — плохой конкурент естественной терминации.

Обычно определяют экспрессию какого-либо удобного белка, например, белка оболочки фага, необходимого для его развития, или белка, обладающего ферментативной активностью; в ген такого белка вводят нонсенс-мутацию. Изучаемую тРНК клонируют в плазмиду, из которой она экспрессируется в клетке в количестве, до 100х превышающем экспрессию соответствующей тРНК из хромосомы. Поэтому влиянием последней можно обычно пренебречь. Степень супрессии может в некоторых случаях приближаться к 100 % (по отношению к выходу исходного белка).

Если первичная структура супрессорной тРНК изменена, возможны разные варианты:

Максимальная супрессия с включением на нонсенс-кодоне мРНК аминокислоты, соответствующей специфичности тРНК-супрессора. Это значит, что детерминанты взаимодействия супрессорной тРНК с синтетазой не изменились;

Включение другой аминокислоты с высокой эффективностью показывает изменение специфичности тРНК по отношению к аминоацил-тРНК синтетазе;

Включение двух-трех разных аминокислот одновременно — значит, тРНК стала субстратом одновременно нескольких синтетаз, которые конкурируют за нее;

Отсутствие включения — тРНК вообще не может аминоацилироваться. Ее детерминанты повреждены.

Оказывается, удобно иногда вводить нонсенс-мутацию в такое место, где аминокислота незаменима. Один из таких примеров — амбер-кодон в таком месте в coat protein фага $\phi 80$, где должен быть обязательно Gln. Другой пример — 234й кодон структурного гена *trpA*, который находится в субстратном центре фермента и требует обязательно Ala или Gly. Тогда при изменении первичной структуры супрессорной аланиновой или глициновой тРНК супрессия исчезает или уменьшается, если аминокислотная специфичность тРНК изменяется полностью или частично. Иногда наоборот, удобно, если нонсенс-кодон находится в области, нечувствительной к аминокислотным заменам, тогда экспрессия белка указывает на наличие аминоацилирования вообще; выделив белок, можно определить, какая аминокислота введена по нонсенс-кодону. Пример - клонированная дигидрофолатредуктаза (DHFR) с amber-мутацией в 10-м кодоне, удаленном от активного центра.

Преимущества метода супрессии: можно наблюдать селективность в "естественных условиях", т. е. при реальной конкуренции всех синтетаз за данную измененную тРНК. Недостатки: можно изучать только тРНК с нонсенс-антикодонами. Если детерминантами специфичности являются нуклеотиды антикодона, мы меняем эту специфичность, когда превращаем ее в супрессорную, т.е. метод непригоден для 25–30 видов тРНК из полного количества 45 в *E.coli*. Но иногда эту трудность удастся обойти.

Метод супрессии не количественный, поскольку на выход супрессии влияет много факторов. Чувствительность его тоже невелика. Заметить включение в белок в месте нонсенс-кодона одновременно двух-трех аминокислот можно только если минорная аминокислота включается в количестве не меньшем, чем 5 % от мажорной (а не 10^{-5} – 10^{-6} , как при испытании *in vitro*). Метод *in vivo* дает, в общем, identity determinants, *in vitro* — recognition determinants

Результаты обоих методов обычно хорошо согласуются, хотя бывают пока не объясненные исключения.

5.4.3 ЭКСПЕРИМЕНТЫ 1974–1986 г.г.

В 1974 г. появилось одновременно несколько пионерских работ. Оказалось, что amber-супрессорная тРНК^{Trp} (с антикодоном CUA вместо CCA), вводит в ответ на амбер-кодон не Trp, а Gln, то есть детерминант триптофаловой синтетазы — C35, а глутаминовой — U35.

Другие авторы супрессировали фаг Ф80 с амбер-мутацией в том месте белка оболочки, где необходим Gln, используя тирозиновую супрессорную тРНК (с антикодоном CUA вместо GUA). Анализ набора естественных мутантов показал, что изменения одного или нескольких нуклеотидов в акцепторном стебле превращала эту тРНК в тРНК со специфичностью Gln, хотя эти замены и не приводили к первичной структуре глутаминовой тРНК.

Эти работы произвели большое впечатление, но оставались почти без развития еще несколько лет.

В 1983 г. Шульман и Пелка, изменяя антикодон метиониновой тРНК *E.coli*, показали, что детерминантами являются все три антикодоновых нуклеотида этой тРНК.

В 1986 г. Норманли и Абельсон (Caltech) сделали ряд важных шагов, а именно, ввели в практику химический синтез гена тРНК с последующим клонированием его в *E.coli*. При этом авторы заменили антикодон GAA в фенилаланиновой тРНК и GCA в цистеиновой тРНК на CUA, сделав их амбер-супрессорными. Эти тРНК супрессировали ген лактозы (I-Z fused gen, определялся по цветной реакции), соответственно, на 50–100 % и на 17–50 % и вводили исключительно свои аминокислоты. Эти же авторы ввели в практику упомянутый выше ген дигидрофолатредуктазы на плазмиде под конститутивным промотором с амбер-мутацией в 10-м кодоне, где замены не влияют на активность фермента. Фермент одноактно можно очистить до 90 %-ной чистоты на аффинной колонке и по Эдману определить аминокислоту.

С помощью этого подхода изучали детерминанты сериновой тРНК. У нее заведомо антикодон не может быть элементом идентичности, т.к. серил-тРНК синтетаза узнает все сериновые тРНК с антикодонами UGA, CGA, GCA и GCU, у которых разные нуклеотиды во всех позициях антикодона. У всех изоакцепторных сериновых тРНК есть 14 одинаковых нуклеотидов, которые отличаются от соответствующих нуклеотидов лейциновых тРНК. Их все перенесли в супрессорную лейциновую тРНК, которая тоже супрессировала DHFR и вводила после такого переноса серин вместо лейцина. Т.е. явно среди перенесенных нуклеотидов находились детерминанты специфичности (Рис. 5.4).

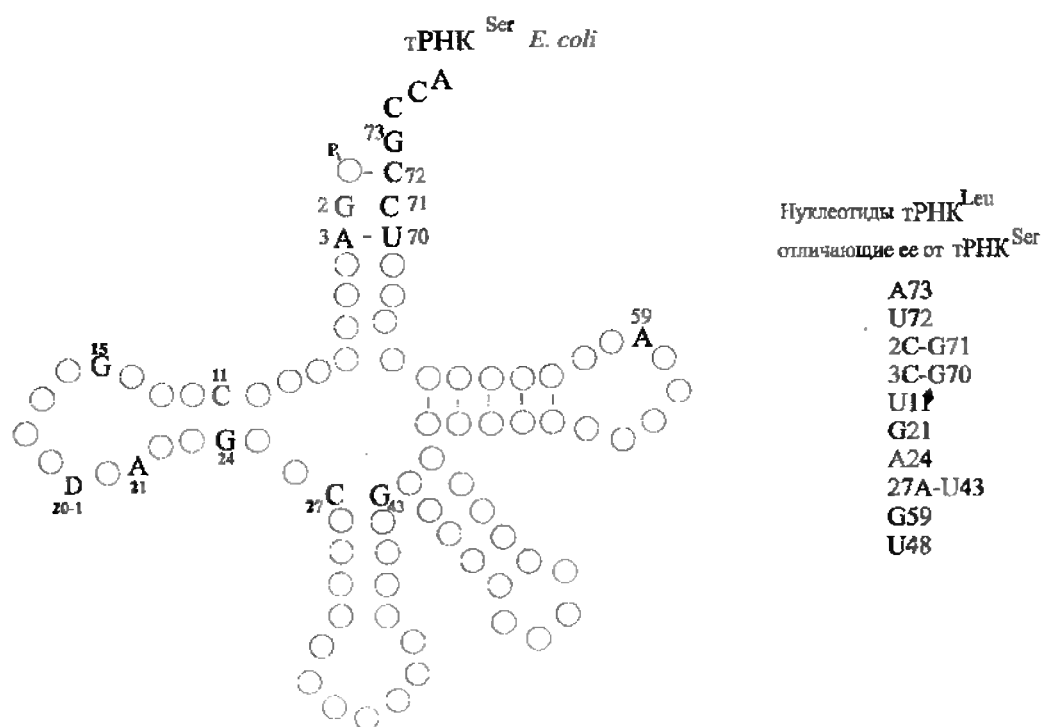


Рис. 5.4 Различия первичной структуры лейциновых и сериновых тРНК
Показаны нуклеотиды, одинаковые у всех сериновых тРНК

Дальнейшие замены и поиск показали, что введение в лейциновую тРНК нуклеотидов сериновой тРНК в позициях 2–71, 3–70, 72, 73 и 11–24 необходимо и достаточно для соответствующей смены идентичности. Однако, не исключено, что еще некоторые элементы сериновой идентичности естественным образом присутствуют в лейциновой тРНК, но в этих опытах не были обнаружены.

5.4.4 АЛАНИНОВАЯ тРНК

Один из самых интересных случаев изучили Хоу и Шиммел в 1988 г. Они установили, что в аланиновой тРНК имеется один главный детерминант идентичности: не вполне комплементарная пара G3-U70 (такая пара довольно обычна во вторичной структуре РНК). Эта пара оказалась уникальной для всех изоакцепторных аланиновых тРНК у всех изученных организмов. Наоборот, ни у каких тРНК другой специфичности такой пары в этом месте нет. Ее замена на A3-U70 или на G3-C70 сразу же уменьшала скорость аминоацилирования, практически, до нуля.

При изменении в аланиновой тРНК любого другого нуклеотида специфичность сохраняется, в том числе и при заменах любого нуклеотида в антикодоне.

В опытах *in vitro* подтвердилось, что аланиновая специфичность сохраняется только у мутантов, сохранивших G3-U70, и ревертирует при восстановлении этой пары.

Пара G3-U70 была введена в супрессорные тРНК другой специфичности, а именно, в фенилаланиновую (нормально у нее G3-C70) и цистеиновую (нормально C3-G70). Они отличаются от аланиновой тРНК почти половиной всех нуклеотидов (31-м и 38-ю, соответственно), а, учитывая общие для всех консервативные нуклеотиды, отличие максимально велико (Рис. 5.5). Тем не менее, они после такой замены супрессируют DHFR, вводя Ala в кодон 10: цистеиновая тРНК — только его, а фенилаланиновая — одновременно с Phe. То есть, можно думать, что в первой детерминант повреждается при введении G3-U70, а во второй — не повреждается.

Введением G3-U70 удастся также получить аланиновую специфичность у лизиновой тРНК *E.coli*.

Однако, не у всех тРНК удастся изменить специфичность на аланиновую простым введением G3-U70. Например, у глициновой. Видимо, детерминант глициновой ARSазы при замене в этом месте не повреждается, и эта тРНК имеет отрицательные детерминанты по отношению к аланиновому ферменту.

Интересно, что аланиновая ARSаза в детерминанте G3-U70 узнает не специфические нуклеотиды, а нарушение комплементарности, ибо введение в супрессорную аланиновую тРНК непарных G.A, C.A, U.U сохраняли, тем не менее, аланиновую специфичность, а все комплементарные пары (A-C, C-C, C-U, U-G) изменяли ее.

5.4.5 MINI и MICRO ШПИЛЬКИ

Не только главный детерминант тРНК^{Ala} находится в акцепторной ветви молекулы. Позднее оказалось, что и у многих других тРНК детерминанты, если не все, то главные, сосредоточены в акцепторном стебле. Например, N73 — детерминант у сериновой, фенилаланиновой, метиониновой, аспарагиновой, гистидиновой, тирозиновой, глутаминовой синтетаз. В акцепторном стебле находятся главные детерминанты гистидиновой и глициновой тРНК. Это привело к идее: попробовать аминоацилировать только небольшую отдельную часть молекулы тРНК, содержащую главные детерминанты.

Сначала это были т.н. “minihelices”, которые представляли собой модель куска тРНК, включающего акцепторный стебель и Т-стебель

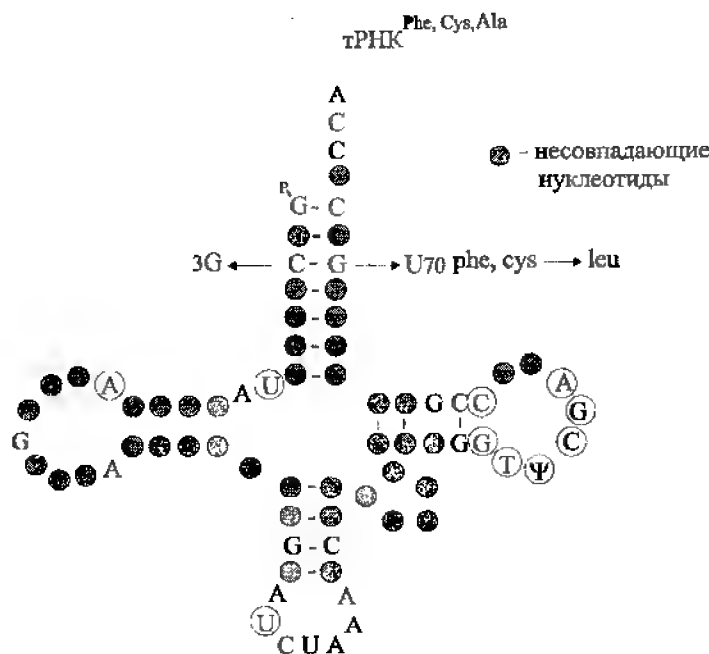


Рис. 5.5. Изменение аминокислотной специфичности фенилаланиновой и цистеиновой тРНК на аланиновую за счет введения G3-U70. Заштрихованными кружками обозначены нуклеотиды, различающиеся у всех трех тРНК. Кружками обведены консервативные нуклеотиды

Далее, стали укорачивать этот субстрат. Шпилька с тетрануклеотидной петлей AACG или UUCG, замкнутой на пару C-G, содержащая всего 4 пары и непарный 5'-конец -ACCA, прекрасно и очень специфически аминоацилировалась аланином со скоростью, всего в 570 раз меньшей, чем полная тРНК, если содержала в соответствующем месте детерминант G.U. Minihelix ацилировался со скоростью в 30-40 раз меньшей, чем полная аланиновая тРНК (Рис. 5.6). Правда, замены некоторых других нуклеотидов шпильки, кроме указанных, влияли на эффективность аминоацилирования, хотя и не сильно.

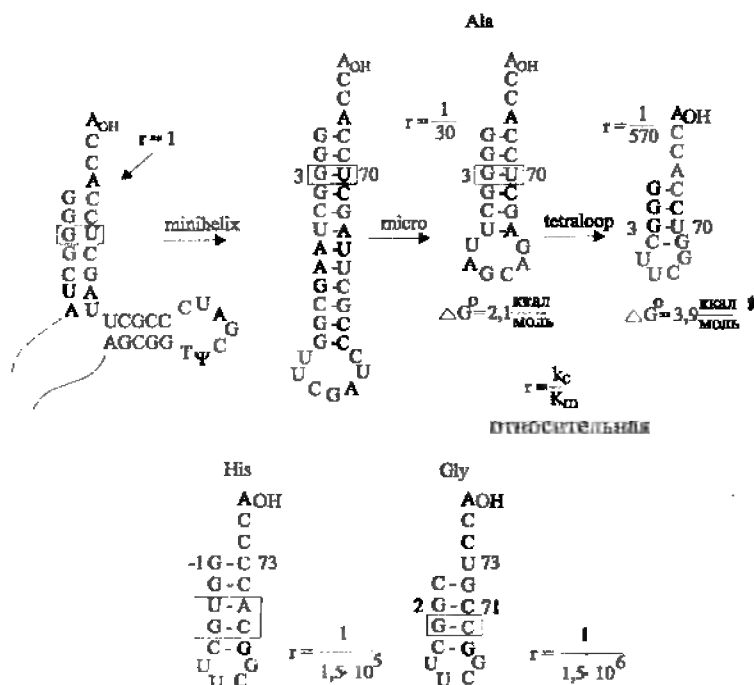


Рис. 5.6. Мини- микро- и тетрапетлевые аминоацилируемые шпильки

Таким образом, мы можем получить термодинамические оценки вклада детерминант, сравнивая — $\Delta G^\circ = RT \ln(k_{cat}/K_m)$ для каждого субстрата с соответствующей величиной, оцененной для простого тринуклеотида CCA. Для целой тРНК получается отношение (k_{cat}/K_m) к соответствующей оценочной величине для шпильки $>8,6 \cdot 10^9$, и вклад всех детерминантов $\Delta \Delta G^\circ > 14 \text{ kcal/mol}$. Для мини-субстрата эта величина на 2,1, а для тетрапептида — на 3,9 kcal/mol ниже. Это и есть возможный вклад отсутствующих в соответствующих субстратах детерминантов.

5.4.6 У НЕКОТОРЫХ тРНК ДЕТЕРМИНАНТОВ МНОГО

Пример множественности детерминантов - фениланиновая тРНК. Для дрожжевой тРНК^{Phe} Шиммел из MIT и Уленбек из Колорадо установили почти полный ряд детерминантов. К ним относятся G20 и A73. G20 в дрожжах присутствует только в фенилаланиновой тРНК. Замена каждого из этих нуклеотидов уменьшает k_{cat}/K_m в 12 раз. Детерминантами служат также и все три нуклеотида антикодона, замена каждого из которых уменьшит k_{cat}/K_m в 3–10 раз. В тех же точках находятся детерминанты аргининовой тРНК и лизиновой тРНК из E.coli. Переносом детерминантов удалось превратить фенилаланиновую тРНК из E.coli и метиониновую, аргининовую и лизиновую тРНК из дрожжей в хорошие субстраты фенилаланиновой ARSазы дрожжей. Эти эксперименты удались потому, что эта ARSаза нечувствительна к минорам, поскольку опыты проделаны на немодифицированной тРНК, синтезированной in vitro. О вкладе отдельных детерминантов во взаимодействие тРНК с дрожжевой фенилаланиновой ARSазой можно судить по таблице:

Таблица

Аминоацилирование дрожжевой Phe-тРНК синтетазой

тРНК-субстрат	замещения	относ. k_{cat}/K_m
дрож фенилаланиновая	—	1,0
дрож фениладаниновая	U20	0,08
E.coli фенилаланиновая	—	0.04
E.coli фенилаланиновая	G20	0,5
дрож метиониновая	G20,G34,A35,A36,A73	0,7
дрож аргининовая	то же	0,6
дрож тирозиновая	то же	1,5

Что касается фенилаланиновой тРНК из E.coli, то у нее, повидимому, 10 детерминантов: U20, G27-C43, G28-C42, G44, U45, U59, U60, A73, причем только два из них (N73 и N20) находятся в тех же местах, что и у дрожжей (Рис. 5.7 и Таблица).

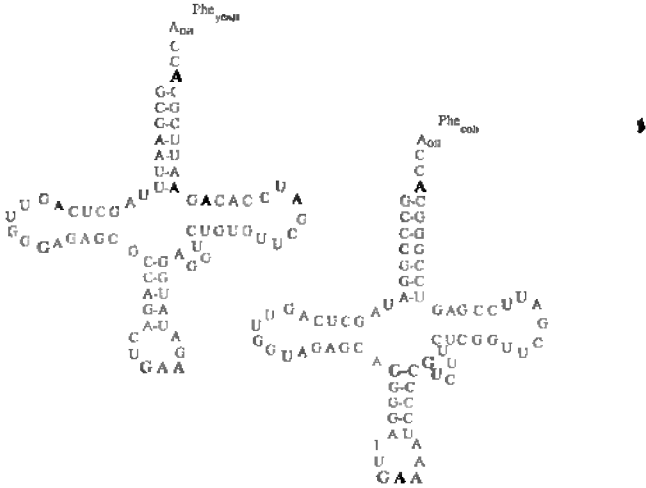


Рис. 5.7 Фенилаланиновые тРНК из E.coli и из дрожжей с детерминантами. Жирным шрифтом помещены детерминанты соответствующих аминоксил-тРНК синтетаз

Упомянутые здесь исследования продемонстрировали, что детерминантами взаимодействия ARSаз со специфическими тРНК являются отдельные нуклеотиды последних, разные и по-разному распределенные в разных фермент-субстратных парах. Не только синтетазы, но и некоторые ферменты процессинга имеют “точечные” детерминанты на тРНК. Например, трансформилаза, формирующая метионин в инициаторной метиониновой tRNA прокариот. Детальная молекулярная структура взаимодействия сейчас постепенно выясняется при рентгеноструктурном изучении различных закристаллизованных фермент-субстратных пар.

ЛИТЕРАТУРА к пп. 5.3–5.4

1. *Феррум Э.* Структура и механизм действия ферментов Мир, М., 1980
2. *Lewin B.* Genes, Oxford University Press, Oxford, 1994 (Льюин Б. Гены, М., Мир, 1987)
3. *McClain W.H.* Rules that govern tRNA identity in protein synthesis J.Mol.Biol. 234(2), 257–280 (1993)
4. *Schimmel P., Pouplana L.R.* Transfer RNA: from minihelix to genetic code Cell 81, 983–986 (1995)
5. *Cuvarelli J., Moras D.* Recognition of tRNA by aminoacyl-tRNA synthetases FASEB J. 7(1), 79–86 (1993)
6. *Singhal R.P., Fallis P.A.M.* Structure, function and evolution of tRNAs (review) Progr.nucl.acid res.mol.biol. 23, 227–290 (1979)

6 ЭЛОНТАЦИЯ

6.1 ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ ОБ ЭЛОНГАЦИИ

Не останавливаясь на достаточно длительной и драматичной истории вопроса, сразу перейду к основным моментам. Для определенности, я буду сначала говорить об прокариотной системе.

Элонгация — это последовательное присоединение аминокислот их аминогруппами к карбоксилу растущей полипептидной цепи. Этот карбоксил прикреплен сложноэфирной связью к молекуле тРНК, а точнее, к 3'-концевой рибозе последней — точно так же, как прикреплена аминокислота к аминоацил-тРНК. В результате реакции “транспептидации” карбоксил растущего полипептида перебрасывается с тРНК на аминогруппу аминокислоты в аминоацил-тРНК, образуя с последней пептидную связь (Рис. 6.1).

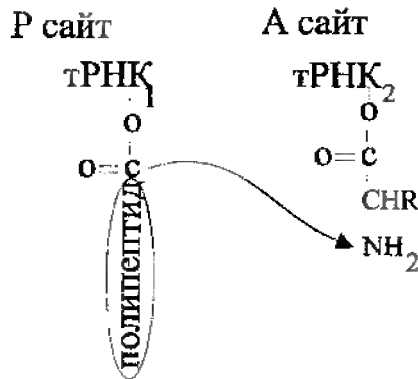


Рис. 6.1 Транспептидация

Таким образом, возникает новая пептидил-тРНК, в которой полипептид вырос на одну аминокислоту, на карбоксильном его конце оказывается новая тРНК, а прежняя тРНК освобождается. Процесс этот повторяется затем многократно до терминации.

Все это происходит на рибосоме, которая имеет соответствующие участки, “сайты”, для связывания обоих субстратов, “донорный” или “пептидилный” — Р и “акцепторный” или “аминоацильный” — А. мРНК проходит сквозь рибосому и экспонирует один из кодонов на Р сайте и соседний (в 3'-направлении) на А сайте. Субстраты удерживаются на сайтах за счет взаимодействия последних с тРНК.

В так называемом “посттранслокационном состоянии” пептидил-тРНК находится на Р сайте и проявляет донорную активность, т. е. способна образовывать пептидную связь с аминокислот-тРНК, соответствующей экспонированному в А сайте кодону (Рис. 6.2 А, Б.). Акцептором пептида может также служить кодон-независимый антибиотик пуромин, структура которого сходна со структурой 3'-конца аминокислот-тРНК (Рис. 6.3).

Реакция с пуримином очень легко определяется, поскольку образующемуся пептидипуриминову нечем удерживаться на рибосоме, и он выходит из рибосомы в раствор.

Аминоацил-тРНК подходит к свободному А сайту в посттранслокационном состоянии в составе т.н. “тройного комплекса”, т. е. в соединении с белковым “EFTu-фактором” и GTP. Если есть кодон-антикодонное соответствие, то GTP распадается до GDP и вместе с EFTu выходит из рибосомного комплекса, аминоацил-тРНК оказывается связанной на А сайте продуктивно, и быстро происходит транспептидация, в результате возникает новая пептидил-тРНК, в которой полипептид вырос на одну аминокислоту, на карбоксильном его конце оказывается новая

тРНК, и сидит, он, по логике, уже не на Р, а на А сайте. На Р сайте же оказывается освободившаяся деацилированная тРНК (Рис. 6.2 В). Эта логика подтверждается тем, что новая пептидил-тРНК, в отличие от первоначальной, не способна снова реагировать ни с тройным комплексом, ни с упрощенными акцепторами, например, с антибиотиком пуромицином. Возникшее в результате транспептидации новое состояние рибосомного комплекса существует реально и называется претранслокационным.

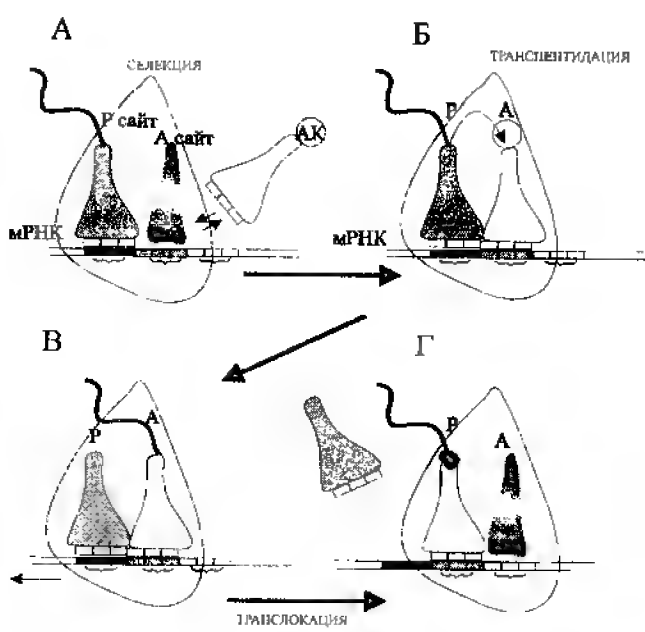


Рис. 6.2 “Двухсайтовая” модель элонгации на рибосоме

Если в системе отсутствует еще один, так называемый EFG-фактор, на этом все остановится. Этот фактор, называется “фактором транслокации”. Когда он, в комплексе с еще одной молекулой GTP приходит к рибосомному комплексу, находящемуся в претранслокационном состоянии, наступает следующий этап — крайне быстрая цепь событий, в результате которых пептидил-тРНК оказывается вновь в донорной позиции, а мРНК продвигается на один триплет. GTP при этом тоже распадается до GDP, EFG-фактор уходит в раствор и может участвовать в новом цикле элонгации. Раньше предполагалось также, что деацилированная тРНК именно на этом этапе уходит с Р сайта в раствор, хотя это не было доказано (Рис. 6.2 Г). Транслокацией этот процесс был назван условно, но позднее было доказано, что в рибосоме происходит реальное перемещение как мРНК, так и молекулы тРНК (в частности, это доказали, используя передачу энергии возбуждения флуоресцентно меченых молекул тРНК и рибосомных белков).

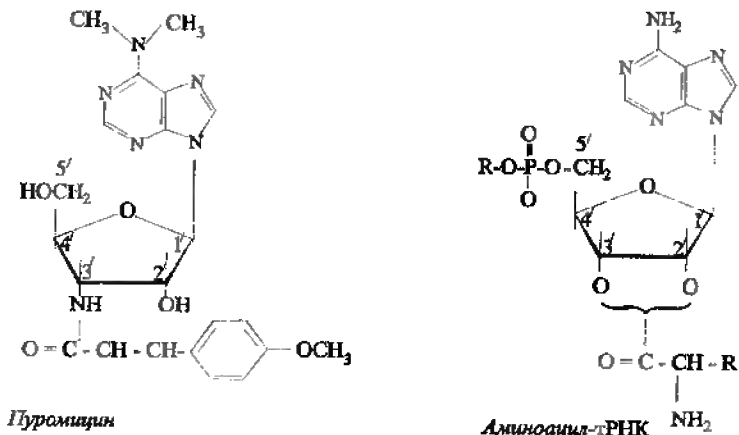


Рис. 6.3 Пуромицин и 3'-конц аминоксил-тРНК

Считается, что изложенную “двухсайтовую гипотезу” сформулировал Дж. Уотсон в 1964 г. на основании накопившихся к тому времени данных, и она не была ничем опровергнута за последующие 30 лет. Но рибосомный комплекс выглядел как “черный ящик”, что, конечно, не могло никого удовлетворить. Схема постепенно детализируется. Накоплено огромное количество структурных данных. Тем не менее, детали молекулярного механизма так и не выяснены. Я расскажу о некоторых принципиальных моментах, которые постепенно все же прояснились.

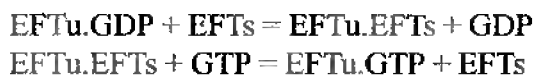
6.2 СЕЛЕКЦИЯ И ТРАНСПЕПТИДАЦИЯ

EFTu и EFG – GTP-связывающие белки, необходимые для элонгации, и в своей структуре они содержат “GTP-связывающий мотив”, сходный у всех G-белков. EFTu был открыт Липманом в 1964–1966 гг. В *E.coli* он имеет мол. массу 43,4 кДа и синтезируется с двух генов *tuf*(A, B) с отличием в одну аминокислоту, но в других отношениях оба гена одинаковы.

EFTu имеет сродство к GTP и к GDP. Считают, что в этих комплексах фактор имеет разные конформации. Сродство к GDP в 100 раз сильнее, чем к GTP, но именно в комплексе с GTP фактор связывает аминоацилированную тРНК любой специфичности, т. е. узнает те детерминанты, которые у всех аминоацил-тРНК одинаковы. EFTu в клетках очень много, до 5 % всего белка и в 7 раз больше по количеству, чем рибосом. Поэтому вся аминоацил-тРНК в клетке не существует в свободном виде, а только в “тройном комплексе”, который имеет большое сродство к А сайту рибосомы. Наоборот, деацилированную тРНК EFTu не связывает. Естественно, комплекс устроен так, что антикодоновая петля из него торчит.

Индекс “u” дан исторически, означает “unstable” т. к. вне комплексов с нуклеотидом или EFTs фактор очень нестабилен.

EFTs в *E.coli* имеет мол. массу 30 кДа и способен сильно связываться с EFTu, вытесняя GDP. Синтезируется он на гене *tsf*. В цитоплазме протекает реакция:



Таким образом, EFTs восстанавливает EFTu.GTP из EFTu.GDP, хотя последний комплекс гораздо более прочен. Нужно только, чтобы GDP в растворе было мало. В бесклеточной системе это достигается за счет введения “GTP(АТФ)-генерирующей системы”, например, фосфоэнолпирувата и ФЭП-киназы.

Как уже говорилось, аминоацил-тРНК в составе тройного комплекса подходит к А сайту рибосомы, находящейся в т.н. посттранслокационном состоянии, т. е. с пептидил-тРНК на Р сайте, и пробует антикодоном экспонированный в нем очередной кодон. Если нет совпадения – он уходит, а если есть – включается некий механизм, приводящий к распаду ГТФ, уходу фактора, фиксации аминоацильного конца тРНК в акцепторной части “пептидилтрансферазного центра” рибосомы, в котором уже фиксирован пептидный конец пептидил-тРНК, что немедленно приводит к транспептидации.

Показано, что декодирование может происходить на изолированной 30S субчастице, т. е. там находится основная часть декодирующего (А) сайта. Наоборот, транспептидация может происходить на 50S даже в отсутствие малой субчастицы, т. е. ПТЦ находится на 50S субчастице.

Некоторые данные о последовательности событий во время декодирования и транспептидации имеются. Известно также, что ГТФазный центр находится на самом факторе, а не на рибосоме, поскольку антибиотик КИПРОМИЦИН заставляет EFTu гидролизовать ГТФ “входную”, в отсутствие рибосом.

Роль факторов и макроэргов не очень ясна. Энергии для транспептидации явно хватает и без дополнительной GTP. На самом же деле сейчас несколько авторов пропагандируют идею о том, что аминоацил-тРНК приходит к А сайту в комплексе не с одной, а с двумя молекулами

EFTu.. Но одно из назначений макроэрга более или менее понятно. Оказывается, схема реакции вполне согласуется со схемой кинетической коррекции Хопфилда, если предположить, что после распада ГТФ аминоацил-тРНК оказывается на рибосоме в состоянии с достаточно высокой свободной энергией, вследствие чего может перед транспептидацией быть испытанной повторно на кодон-антикодоновое соответствие. Если оно неполное, с большой вероятностью транспептидация не произойдет, и аминоацил-тРНК вывалится с А сайта в раствор и ГТФ, таким образом, окажется израсходованным зря (Рис. 6.4).

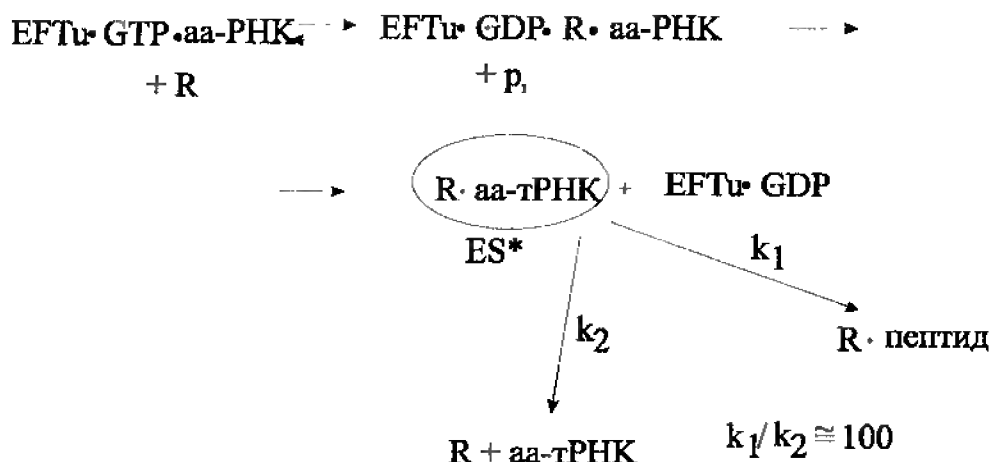


Рис. 6.4. Кинетическая коррекция на рибосомах при элонгации (R — рибосома)

Томсону и Диксу удалось показать, что, если рибосомы находятся в посттранслокационном состоянии, и в среде вокруг них имеется только аминоацил-тРНК с антикодоном, не соответствующим экспонированному в А сайте кодону мРНК, пептидная связь может все-таки образоваться, но израсходовано будет до сотни молекул ГТФ на одну пептидную связь, т. е. пруффридинг улучшает первоначальный отбор еще в 100 раз.

Но зачем это нужно? Селекция тРНК на рибосоме может идти только за счет кодон-антикодового узнавания, поскольку все остальные взаимодействия тРНК с рибосомой универсальны по отношению ко всем тРНК. Правильная кодон-антикодовая пара от неправильной в некоторых случаях может отличаться только одним нуклеотидом и $\Delta\Delta G$ может определяться только одной водородной межунклеотидной связью. Наблюдая селективность в растворе, например, скажем, при взаимодействии двух тРНК с взаимно комплементарными антикодоновыми петлями, показали, что f_0 обычно не лучше 0,01, а для некоторых комбинаций — даже 0,1. Очевидно, что кодон-антикодовое узнавание на рибосоме должно быть гораздо более селективным, чем в растворе, вне рибосомы. И это считали парадоксом, нуждающемся в объяснении. Но, с другой стороны, мы знаем, что полимеразы подбирают комплементарные пары нуклеотидов с ошибкой 10^{-4} и даже 10^{-5} одноэтапно, даже без кинетической коррекции. В принципе, это так же парадоксально. Но почему-то в этом случае никто не удивляется. Скорее всего, и в полимеразе и в рибосомах селективность увеличивается за счет предотвращения доступа воды в место контакта и/или за счет строгих стерических ограничений, налагаемых жесткой белковой матрицей. Этой точности должно быть достаточно. Зачем же дополнительный пруффридинг? За неимением лучшего, предполагают, что из-за большой скорости работы рибосома не может использовать всю потенциальную селективность на первом этапе, и необходим второй. Есть даже экспериментальные данные о том, что чем быстрее идет элонгация, тем больше ошибок.

Наличие кинетической коррекции проявляется в интересном явлении, обнаруженном гораздо раньше, чем этот механизм был понят, а именно в существовании рибосом с повышенной и с пониженной точностью трансляции (ram — ribosomal ambiguity mutations). Результат действия

антибиотика стрептомицина проявляется в том, что резко возрастают ошибки трансляции. Однако, можно отобрать штаммы, устойчивые к Sm, и даже зависимые от него, т. е. наоборот, дающие много ошибок как раз в отсутствие антибиотика. Подробные исследования показали, что эти эффекты связаны с мутациями в рибосомных белках S4 и S5, а также L7/L12 (ошибки трансляции и чувствительность к Sm возрастают) и S12, S17 и L6 (ошибки и чувствительность к Sm уменьшаются). Повышенная точность трансляции, связанная с изменением S12 как раз и приводит к устойчивости к Sm. Аналогичное явление описано и в р-белках дрожжей. Ноллер предположил, что gam-мутации приводят к нарушениям в механизме пруфридинга. Позднее было показано, что и рРНК участвует в этом деле, а именно, замены N517, 912, 1054, 1404, 1495 в 16S, 2559 и 2661 — в 23S влияют на точность трансляции. Сшивками и другими методами показано, что все эти нуклеотиды близки друг к другу и к месту декодирования в пространственной структуре рибосомы, и эта область называется иногда “центром точности”. Хотя гипотеза Ноллера пока не может считаться доказанной.

Как непосредственно взаимодействуют кодон с антикодоном на рибосоме, т. е. какова геометрия комплекса? Могу сказать сразу, что это неизвестно. Если рассмотреть антикодоны известных тРНК, у которых нуклеотиды не модифицированы, то очевидно, что для первых двух нуклеотидов справедливо обычно правило Крика-Уотсона. Для третьего же — это правило нарушается, и часто антикодон узнает несколько разных кодонов, различающихся по третьей букве. На этом, между прочим, основаны предположения о том, что первоначально код был двухбуквенным. Рассматривая молекулярные модели и допуская, что третий нуклеотид кодона не очень жестко фиксируется на рибосоме при декодировании, Крик обосновал правило для третьего нуклеотида кодона, названное Wobble гипотезой (гипотезой “качаний”), которая предсказывала значение третьей буквы антикодона, которую он может узнавать (см. таблицу). На самом деле, это “качание” допускает просто возможность образования “квази-комплементарной пары G.U. О том, как именно организовано взаимодействие кодона с антикодоном на декодирующем сайте рибосомы мы можем только строить гипотезы. Считается (по Fuller и Hodgson (Nature, 215, 857(67))), что антикодоновая петля тРНК имеет так называемую “3'-конформацию”, в которой антикодон (нуклеотиды 34–36) и соседние с ним нуклеотиды 37–38 образуют спираль, продолжающую биспиральную часть шпильки, и при взаимодействии кодона с антикодоном возникает трехзвенный участок биспирали. Из этой модели и исходил Крик при обосновании wobble гипотезы указано в таблице.

Т а б л и ц а

Wobble-правила при декодировании

5'-нуклеотид антикодона	Узнаваемый 3'-нуклеотид кодона
UА,	G
C	G
A	U
G	U, C
I(инозин)	U, C, A

(инозин часто встречается в антикодонах и отличается от аденозина тем, что вместо -NH₂, у шестого углерода основания стоит карбоксильный кислород -O)

Уже говорилось о том, что и в составе антикодона и рядом с ним часто встречаются, кроме инозина, еще и другие модифицированные нуклеотиды, образующиеся в ходе процессинга. Модификации могут быть таковы, что нормальная Крик-Уотсоновская пара вообще не может образоваться. В результате каких-то структурных изменений прочтение кодонов может изменяться в зависимости от таких модификаций и отклоняться в ряде случаев от wobble-правила.

Какова реальная точность трансляции?

Из сказанного выше вытекает, что точность трансляции не должна быть чрезмерно большой — это чревато замедлением скорости роста и перерасходом макроэрга из-за действия слишком мощного механизма кинетической коррекции. Естественно, она и не должна быть чрезмерно малой. Априори можно предположить, что допустимый уровень ошибочных включений аминокислот — менее одной на среднюю белковую цепь, т. е. на несколько сотен включаемых аминокислот. Иначе все белки будут иметь ошибки и многие из них не смогут выполнять свои функции. Что же дает эксперимент? *In vitro* на синтетической матрице эксперимент поставить нетрудно. Например, синтез на поли(U) приводит к включению в полифенилаланиновую цепь (кодон UUU или UUC) довольно заметного количества лейцина (кодон UUA или UUG). Но тут же выяснилось, что условия, необходимые для максимальной точности в бесклеточной системе, трудно соблюсти, поскольку ошибки зависят от очень многих внешних параметров. Совсем не просто экспериментально проверить наличие ошибок элонгации *in vivo*. Очень трудные и изящные эксперименты, в общем, подтвердили оценку: порядка $0,3 \cdot 10^{-3}$ на аминокислоту. Сейчас используется обычно очень удобная модель — нонсенс-кодон в каком-либо экспрессируемом гене. “Ошибкой” в этом случае можно считать прочтение этого кодона, как значащего, и о количестве ошибок можно судить по экспрессии соответствующего белка. Получаемые результаты, правда, лишь косвенно зависят от ошибочности прочтения нонсенс кодона, поскольку в эксперименте определяется непосредственно только конкуренция тРНК с RF-факторами. Но это обстоятельство можно учесть. Эксперименты показали также, что точность при трансляции может быть различной для разных белков. Почему — я сказать не могу. Один из возможных механизмов явления связан с разной частотой употребления кодонов-синонов. Оказывается, что кодоны одной и той же аминокислоты используются с разной частотой (минорные и мажорные кодоны). Мажорные чаще встречаются в мажорных белках, минорные — в белках, которых в клетках мало. Оказалось, что и скорость трансляции минорных кодонов в составе мРНК значительно меньше, чем мажорных. Это доказано *in vitro* и *in vivo*. Возможно, что этим регулируется экспрессия отдельных белков. Но и точность их прочтения может быть разная. Это тоже доказано экспериментально. Интересно, что мажорные кодоны в *E.coli* могут быть минорными в дрожжах, и наоборот.

Уже говорилось, что ошибки при биологических взаимодействиях есть следствие конкуренции “правильного” субстрата с присутствующим в среде похожим, но “неправильным” субстратом. Поэтому имеет значение не только разница в свободной энергии образования правильного и ошибочного комплекса, но и отношение концентраций этих субстратов. При трансляции на рибосоме отбираемая из смеси аминоацил-тРНК имеет много конкурентов. Если отбираемую аминокислоту (или соответствующую ей тРНК) из клетки убрать (или концентрацию ее сильно уменьшить), то вероятность неправильного включения на соответствующем кодоне может многократно возрасти. Рибосомный комплекс как бы “спотыкается” (“stagger”) на “голодном” (“hungry”) кодоне и в белки в очень большом числе случаев будет вставлена в заданное “голодным” кодоном место другая аминокислота — конкурент. Если клетка от этого не погибает, то удастся наблюдать, например, при электрофорезе, появление сателлитных полос в геле в районе данного белка из-за многочисленных замен аминокислот.

Здесь мы говорили только о точности элонгации. Но возможны также и ошибки, связанные со сдвигом рамки считывания. О них несколько слов будет сказано позднее.

6.3 ТРАНСЛОКАЦИЯ

Теперь перейдем к следующему этапу элонгации — к транслокации. EFG фактор был открыт в тех же работах Липмана с сотр. 1964–1966 гг. В *E.coli* он состоит из одной полипептидной цепи, синтезируемой (в *E.coli*) с гена *fusA* и имеющей молекулярную массу 77,4 кДа. Он содержится в клетке в количестве, эквивалентном количеству рибосом (т. е. в 10 раз меньше, чем EFTu). Комплекс с гуанил-нуклеотидами он образует только в присутствии рибосом

или 50S субчастиц. Характерный антибиотик для этого фактора — fusidic acid, которая не дает фактору уйти из рибосом после транслокации. Интересно, что, хотя в присутствии антибиотика транслокация и происходит, тройной комплекс связаться уже не может. Это (и другие эксперименты) показало, что сайты связывания обоих факторов перекрываются.

В присутствии рибосом EFG быстро гидролизует GTP, даже если нет трансляции. Этот “uncoupled” распад, собственно, и явился главной помехой при измерении соотношений между количеством образовавшихся пептидных связей и расщепившейся GTP (сначала думали, что моль/моль, потом 1:2, а теперь некоторые авторы даже утверждают, что 1:3. Все же в учебниках пока принято писать, что на пептидную связь расходуется две GTP, одна на декодирование (с EFTu), и одна — на транслокацию (с EFG).

Напомню, что в результате транслокации происходит распад GTP до GDP, пептидил-тРНК оказывается вновь в донорной позиции, мРНК продвигается на один триплет, а Р сайт освобождается от деацилированной тРНК.

Как, собственно, происходит транслокация, и что приводит в действие механизм протяжки мРНК и передислокации пептидил-тРНК — неясно. Даже в отсутствие фактора, процесс идет, хотя и медленно, и фактор просто его ускоряет.

Очевидно, что для понимания механизмов нужно, как минимум, хорошо знать молекулярную природу сайтов. Имеется масса структурных данных. Известны области на поверхности рибосомы, где расположены те или иные сайты (А и Р сайты, места связывания мРНК, ПТЦ и декодирующий центр, расположение концов мРНК и рРНК, факторов, и т.д. Известны белки и области рРНК, расположенные поблизости от каждого из них. Известны также первичные структуры факторов и с хорошим разрешением пространственные структуры EFTu.GDP, EFTu.EFTu, EFG, EFG.GDP. Но решить задачу полностью пока не удастся. Отмечу только некоторые успехи, позволившие заметно продвинуться вперед.

До середины 70-х гг. А и Р сайты были гипотетическими. Исследовать их подробно мешало то, что из-за плохих препаратов рибосом тРНК связывалась с ними не стехиометрически. Ясно, что если вы видите, скажем, 0,5 моль тРНК на моль рибосом, трудно судить о количестве сайтов. Улучшая препараты, удалось довести количество связываемой тРНК до 3 молекул на рибосому. Стало очевидно, что тРНК связывается не только на А и на Р сайте, но и на третьем сайте, который называли “exit site” (Е). По всей видимости, деацилированная тРНК с Р сайта на стадии транслокации не уходит в раствор, а переходит на Е-сайт, где она уже не взаимодействует с мРНК и связана довольно слабо. В раствор она переходит только при следующей транслокации. Сейчас это точно доказано. Возможно, но не доказано, что это необходимо для облегчения трансляции — свободная энергия, необходимая для выхода прочно связанной на Р сайте после транслокации деацилированной тРНК, затрачивается в два этапа.

Еще важный момент. Я уже упоминал, что А сайт распространяется на обе субчастицы. То же имеет место и по отношению к Р сайту. Только Е сайт целиком расположен на 50S субчастице. Несколько лет назад было показано, что тРНК, связанная в А сайте, защищает от химической модификации несколько определенных нуклеотидов рРНК и на малой и на большой субчастицах (соответственно, в 16S и 23S рРНК). Другие наборы нуклеотидов, тоже на большой и малой субчастицах, защищены молекулой тРНК на Р сайте. Наконец, на Е сайте защищены несколько определенных нуклеотидов только на 23S. Можно, таким образом, говорить, что тРНК связывается в А/А', Р/Р' и Е положениях. Но при поэтапном проведении элонгации (сначала связывание тройного комплекса на А сайт, затем транспептидация и потом транслокация) наблюдали защиту молекулой тРНК еще и А/Р' и Р/Е наборов. Таким образом, возникла гипотеза о том, что транслокация тРНК не происходит с А на Р и затем на Е одновременно. Сначала с А на Р и одновременно с Р на Е на 50S субчастице перебрасываются акцепторные концы L-образных молекул тРНК (при транспептидации), а затем уже, под влиянием EFG-фактора с GTP на малой субчастице переходил с сайта на сайт антикодоновый конец тРНК, находящийся на другом конце L-молекулы (Рис. 6.5). Кроме футпринтов, есть и другие данные в пользу этого предположения.

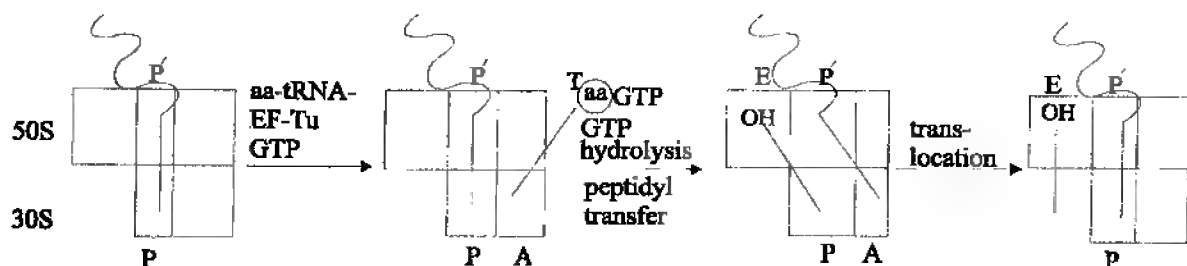


Рис. 6.5. “Гибридная” модель элонгации. тРНК показана черточкой, полипептид - волнистой линией. Изображен предполагаемый поэтапный переход тРНК с сайта на сайт.

“Виновниками” переходов являются, возможно, перемещения субчастиц относительно друг друга. Может быть, именно для этого рибосомы всех на свете организмов состоят из двух субчастиц. Но как это происходит конкретно — непонятно, хотя моделей предложено немало. Согласно представлению о “гибридном” связывании тРНК на сайтах, перемещение антикодонных концов L-образных молекул тРНК с А на Р и с Р на Е сайты — первично. А мРНК перемещается уже вторично, вследствие ее взаимодействия с тРНК. Такое перемещение должно быть термодинамически выгодно. Как при этом используется энергия GTP — неизвестно.

Еще один важный момент. Доказано, что не только на А, но и на Р сайте имеет место кодон-антикодонное взаимодействие, хотя априори это ниоткуда не следует. Для чего это нужно?

Если мРНК перемещается при транслокации вследствие ее взаимодействия с тРНК, то, может быть, для этого и нужно кодон-антикодонное взаимодействие на обоих сайтах. Мы увидим в дальнейшем, что, по всей вероятности, этим взаимодействием обеспечивается также и постоянство рамки считывания. Если две молекулы тРНК (аминоацил- и пептидил- в посттранслокационном состоянии) одновременно связаны в А и Р сайтах и при этом взаимодействуют с соседними кодонами мРНК, антикодонные петли должны быть сближены. Есть даже и прямые указания на то, что эти петли взаимодействуют друг с другом. Но и аминокислотные концы должны быть рядом на ПТЦ для того, чтобы могла произойти транспептидация. Достаточно надежно показано также, что L-форма тРНК на рибосоме не изменяется. Очевидно, что середины L-образных молекул должны быть развернуты друг относительно друга поскольку толщина их довольно велика, а между экспонированными кодонами на мРНК должен быть излом (Рис. 6.6). Этот излом и предотвращает, быть может, проскальзывание рибосомы по мРНК.



Рис. 6.6. Две молекулы тРНК рядом, на Р и на А сайтах

6.4 СКОРОСТЬ ЭЛОНГАЦИИ

С какой скоростью идет трансляция, т. е. сколько времени занимает акт элонгации? В принципе, ясно, как следует поставить эксперимент. Надо дать клетке на очень короткое время "импульс" радиоактивных аминокислот и, по прошествии некоторого промежутка времени, остановить элонгацию, выделить белок и посмотреть, как радиоактивные аминокислоты распределены по полипептидной цепи. Сначала метится С-конец, постепенно радиоактивность появляется в середине цепи, а потом и в N-конце (Рис. 6.7).

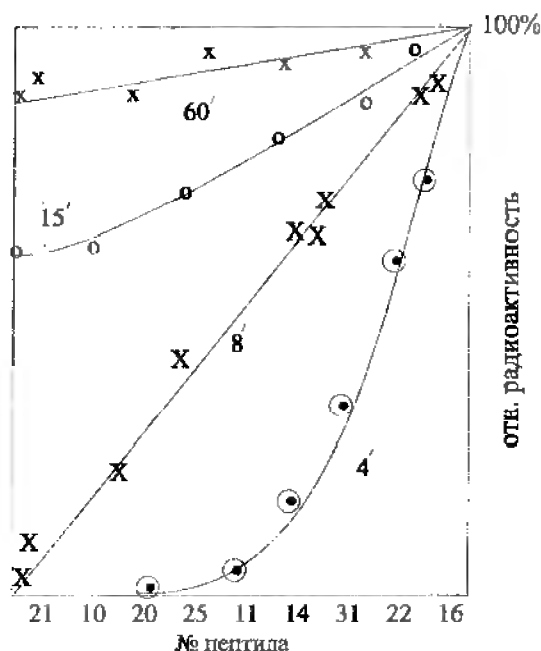


Рис. 6.7 Кинетический эксперимент в ретикулоцитах. Полипептиды со случайными номерами расставлены в направлении от С к N концу.

Такие опыты в ретикулоцитах показали, что один акт элонгация требует нескольких секунд. Более трудные опыты с бактериальными клетками (*E.coli*) показали скорость порядка 20 аминокислот/сек. Это, повидимому, верхний предел скорости.

Что касается бесклеточной системы, то долгое время само собой подразумевалось, что трансляция идет там очень медленно. Лишь в последние годы удалось создать систему, которая, за счет качества препаратов рибосом, подбора оптимальных ионных условий (в частности, добавления полиаминов, частично заменяющих ионы магния), ведет синтез белка со скоростью, сравнимой с той, что наблюдается в клетках *E.coli*. Тем не менее, до настоящего времени не удалось собрать бесклеточную систему, которая синтезировала бы макроскопические количества белка по заданной мРНК (более 0,1 мг/мл), хотя такая система открыла бы массу новых практических и исследовательских возможностей. Причина этого пока остается непонятной *)

6.5 АНТИБИОТИКИ

Огромное количество антибиотиков действует именно на трансляцию. Одно перечисление заняло бы целую страницу. Можно сейчас подобрать ингибиторы буквально для каждого этапа элонгации. Исследование места их действия шло параллельно с выяснением деталей самого механизма элонгации, и именно применение антибиотиков позволило разобраться в деталях

*) см. выше примечание к стр. 12

этого механизма. О некоторых антибиотиках я уже упоминал, о других рассказывать не буду. Из всем известных к ним относятся тетрациклин — препятствует связыванию тройного комплекса на А сайте, стрептомицин — вызывает ошибки трансляции, хлорамфеникол (левомицетин) — препятствует транспептидации у прокариот, и другие. Для многих из них найдены точки взаимодействия с рРНК, и большинство таких точек группируется в определенных участках пространственной структуры, и именно в тех, где находятся предполагаемые функциональные центры. Как ни странно, только для пурамицина понятен молекулярный механизм действия.

6.6 ЭНЕРГЕТИКА ЭЛОНГАЦИИ

Как и всякая реакция, вся элонгация и каждый ее этап проходят в направлении уменьшения свободной энергии. Если говорить об общем балансе энергии всего процесса, то мы имеем исчезновение одной сложноэфирной связи аминокислота-тРНК, и появление одной пептидной связи. Первая из них — макроэргична (около 7 ккал/моль), вторая — требует затраты всего около 0,5 ккал/моль. Так что энергии более, чем достаточно. И действительно, дипептиды образуются в определенных условиях из аминоацил-тРНК даже вне рибосом под действием, например, эстераз. Очевидно, что распад еще, как минимум, двух молекул GTP на каждый акт элонгации необходим для термодинамического обеспечения отдельных этапов элонгации, необходимой точности и скорости процесса. В результате, энергетическая “цена” трансляции очень велика. Интенсивно растущая бактериальная клетка расходует, например, до 90 % всей вырабатываемой АТФ на трансляцию.

Многие результаты ранних экспериментов, в которых определяли расход GTP в модельных системах *in vitro*, были позднее подвергнуты сомнению, т.к. этот расход определяли на фоне интенсивного непроизводительного распада GTP.

6.7 ЭЛОНГАЦИЯ У ЭУКАРИОТ

Процесс элонгации у эукариот протекает аналогично элонгации у прокариот. Как и у бактерий, рибосомы 80S состоят из двух субчастиц, имеют А, Р и Е сайты. Что касается факторов элонгации эукариот, то исследуются они с трудом, поскольку обычно при выделении входят в состав больших молекулярных агрегатов. Из последних можно выделить аналог EFTu — белок eEF1(α) с молекулярной массой 50 кДа. Из агрегатов выделен также аналог EFTs, фактор eEF1(β) с мол.массой 27 кДа. Есть, однако, некоторые отличия в ходе реакции, не имеющие принципиального характера.

Аналог EFG, фактор eEF-2, тоже выделен и изучен. Молекулярная масса его у позвоночных 110 кДа. И здесь есть отличия, тоже не принципиальные. Например, фактор образует комплекс с GDP и вне рибосомы, чего не наблюдается у EFG в прокариотах. В этом отношении интересно также действие дифтерийного токсина. Оказалось, что его токсические свойства заключаются в том, что он фосфорилирует определенное место в eEF-2 с участием NAD. Прокариотный же фактор он не фосфорилирует.

В заключение хочу отметить, что в течение долгого времени рибосомный комплекс представлялся “черным ящиком”. То есть что в него входит и что выходит — было понятно, но как разыгрывается вся цепь событий, какие молекулярные механизмы приводят их в движение — было неясно. Но в последнее время появилась масса новых структурных данных, и даже динамических. Обнаружены конформационные изменения факторов элонгации и даже рРНК на разных этапах трансляции. Факторы и тРНК удается видеть прямо на поверхности рибосомы в пре- и посттранслокационном состоянии. Выказаны очень правдоподобные, хотя иногда и противоречащие друг другу гипотезы о механизме отдельных этапов элонгации. Так что решение проблемы, видимо, не за горами.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж.* Молекулярная биология клетки 1е изд. Мир М., 1986, или 2е изд., 1994.
2. *Шанвиль Ф, Эппи А.* -Л. Биосинтез белка, Мир, М., 1977
3. *Lewin B.* Genes, Oxford University Press, Oxford, 1994 (*Льюин Б. Гены*, М., Мир, 1987)
4. *Czworkowski J., Moore P.B.* The elongation phase of protein synthesis *Progr.nucl.acid res.mol.biol.* 54, 293–332 (1996)
5. *Lieberman K.R., Dahlberg A.E.* Ribosome-catalyzed peptide-bond formation *Progr.nucl.acid res.mol.biol.* 50, 1–23 (1995)
6. *Rich A.* How transfer RNA may move inside the ribosome In: *Ribosomes Nomura M., Tissieres A., Lengyel P.* (eds.) Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, N. Y., pp.871–884, 1974
7. *Nagano K., Harel M.* Approaches to a three-dimensional model of E.coli ribosomes *Progress in biophysics and molecular biology* 48, 67–101 (1987)
8. *Green R., Noller H.F.* Ribosomes and translation *Annu.Rev.Biochem.* 66, 679–716 (1997)
9. *Wimberly B.T., Guimon R., McCutcheon J.P., White S.W., Ramakrishnan V.* A detailed view of a ribosomal active site: the structure of the L11-RNA active complex *Cell* 97(4), 491–502 (1999)
10. *VanLoock M.S., Easterwood T.R., Harvey S.C.* Major groove binding of the tRNA-mRNA complex to the 16S ribosomal RNA decoding site *J.Mol.Biol.* 285(5), 2069–2078 (1999)
11. *Inhibitors of protein biosynthesis, Vazquez D.* (ed) Springer-Verlag, Berlin, 1979

7 ТЕРМИНАЦИЯ

Терминация изучена слабее, чем другие этапы трансляции. Сейчас ее стали изучать гораздо интенсивнее, поскольку выяснилось, что этот этап тоже важен для регуляции в клетках. Думают, что когда трансляционный процесс достигает терминаторного кодона, возникает пауза, после которой, в принципе, могут быть разные события: терминация, включение специальной аминокислоты, прочтение случайной аминокислотой, или сдвиг рамки.

Сигналами терминации в трансляции служат кодоны UAA, UAG или UGA (соответственно, "ochre", "amber" и "opal"). В *E. coli* UAA — самый мощный терминатор, UAG — менее эффективен, UGA — дает нормально утечку ("leakage") порядка 1–3 %. Когда при трансляции такой кодон оказывается на А сайте, то, поскольку соответствующей этому кодону тРНК в клетке нет, белковый фактор терминации (release factor, RF) получает возможность подойти к А сайту и вызвать гидролиз пептидил-тРНК, находящейся на Р сайте, с освобождением nascentного полипептида и выходом его и свободной тРНК из рибосомы. В прокариотах были открыты уже довольно давно три RF-фактора. Два из них узнают терминирующие кодоны: RF1 узнает UAA и UAG, а RF2 — UAA и UGA. Третий фактор, RF3, используя GTP, стимулирует работу RF1 или RF2, но он, в отличие от первых двух, почему-то не является абсолютно необходимым для клетки. Этот факт разные гипотезы объясняют по-разному. Может быть, его могут как-то заменить EFG или EFTu. Названия генов в *E. coli*, экспрессирующих RF-факторы: *prfA*, *prfB*, *prfC*. Эти гены в *E. coli* клонированы. RF1 и RF2 имеют много аналогий в первичной структуре.

Предполагается, что гидролиз, т. е. перенос карбоксила растущего полипептида на воду вместо аминогруппы очередной аминокислоты, катализируется тем же самым пептидилтрансферазным центром рибосомы, т. е. терминация есть модифицированная транспептидация, с переносом пептида на воду. Как это выглядит на молекулярной модели — пока неясно. Нуждается в объяснении, например, то, что ПТЦ удален от декодирующего сайта, дающего сигнал терминации. Возможно, что один из доменов RF1/2 узнает сигнал на А сайте, а другой — дотягивается до ПТЦ и управляет гидролизом. Существуют гипотезы о том, что RF3 образует комплекс с RF1/2, и GTP, пространственно подобный тройному комплексу EFTu.GTP.aa-tRNA, хотя вне рибосомы такой комплекс не наблюдали.

Интересны данные о том, что рРНК и в терминации принимает прямое участие. Например, кодон UGA мРНК и консервативный участок U m⁵ C A1408 в 16S рРНК взаимно комплементарны и легко сшиваются химически. Существует даже предположение о том, что первоначальное событие терминации — узнавание терминирующего кодона не фактором, а рРНК, а именно, 34-м и 44-м участками 16S рРНК, а фактор взаимодействует уже с образовавшимся дуплексом.

В эукариотах фактор eRF1 универсален по отношению ко всем трем стоп-кодонам; он чрезвычайно консервативен в ходе эволюции эукариот, хотя на прокариотный фактор мало похож. Имеется также и аналог RF3, eRF3; он был найден только недавно. В отличие от прокариот, в эукариотах оба фактора необходимы для выживания клетки.

Количество eRF факторов составляет примерно 5 % от количества рибосом. Показано, что eRF3 имеет аминокислотную аналогию с eEF1(α) и в его составе обнаруживается GTP-связывающий мотив. Аналогия также послужила стимулом для гипотез о сходстве механизмов действия обоих факторов, поскольку они оба действуют на А сайте рибосомы.

Мы уже говорили о явлении супрессии, т. е. о том, что молекулы тРНК могут мутировать, естественным образом или искусственно, так, что их антикодон узнает в структурном гене нонсенс-кодон, amber, ochre или opal. Тогда этот кодон прочитывается как значащий, и ген экспрессируется в “супрессорном” хозяине, т.е. клетках, в которых имеется супрессорная тРНК. Естественно, что в результате ошибок узнавания, нонсенс-кодон может быть прочитан и какой-нибудь не-супрессорной тРНК с близким антикодоном. Мало того, мы увидим дальше, что в некоторых организмах содержатся и естественные тРНК, узнающие какой-либо из “бессмысленных” кодонов. Очевидно по логике, что ход событий на таком кодоне определяется конкуренцией между соответствующей тРНК и RF-фактором. Это подтверждается тем, что, как и следовало ожидать, суперэкспрессия RF1 и RF2 (даже без RF3) делает клетки *E.coli* не супрессируемыми. В эукариотах (дрожжах) только суперэкспрессия обоих факторов eRF1 и eRF3 одновременно делает клетки не супрессируемыми.

Я уже объяснял, почему супрессорная тРНК успешно конкурирует с RF на стоп-кодоне и не мешает заметным образом термации остальных белков в клетке. Оказывается, для эффективной термации важен контекст, который при естественной термации обязательно присутствует. Эффективность термации увеличивается на два порядка величины при оптимальном контексте, и поэтому супрессорная тРНК - плохой конкурент естественной термации. Фактически, можно считать, что термация происходит на последовательности, более длинной, чем три нуклеотида. Поэтому сейчас различают термины “стоп-кодон” (“нонсенс-кодон”) и “терминирующий кодон”. Благоприятные контексты, по-видимому, различаются у разных организмов. В *S.cerevisiae*, как и в *E.coli*, термация идет на UAA>UAG>UGA, а с 3'-стороны помогают G>A = U>C (U>A>G>C в *E.coli*, A = G >> C = U у млекопитающих). Обратное влияние имеют эти нуклеотиды для прочтения кодона как значащего. Можно считать, таким образом, что терминирующий кодон, особенно в эукариотах, по крайней мере, тетра-нуклеотидный.

В прокариотах для термации важен также и предконцевой кодон, и термация идет лучше всего после кодонов ионизируемых аминокислот. В некоторых мРНК контекст имеет решающее значение. Наблюдался случай, когда фланкирование нонсенс-мутации с двух сторон неблагоприятным для термации контекстом усиливали супрессию в 250 раз!

Относительно плохо узнаваемые факторами стоп-кодона используются иногда для термации слабо экспрессируемых белков. Контекст как раз и управляет упомянутым выше выбором хода событий на терминаторном триплете, т.е. определяет, произойдет ли термация, включение специальной аминокислоты, прочтение кодона случайной аминоацил-тРНК, или сдвиг рамки. Сдвиг, например, имеет место при нормальной экспрессии гена RF2 в *E.coli*, в котором имеется кодон UGA, который с заданной вероятностью преодолевается рибосомой и при этом сдвигается рамка считывания, что, как думают, служит для регулирования экспрессии.

В работе, например, Tate et al. (1996) проанализированы 40000 участков термации из 138 организмов! Тем не менее, найти оптимальный контекст нелегко, и полной ясности в этом вопросе нет.

7.1 ТЕРМИНАЦИЯ И СУПРЕССИЯ. ТЕРМИНАЦИЯ РИБОСОМАМИ

Между прочим, небольшая супрессия терминирующих кодонов (от сотых долей до 1–2 %) происходит, как норма, в результате неправильного узнавания их стандартными, не супрессорными тРНК. Видимо, это тоже зависит от контекста.

Супрессия “нормальными” тРНК стимулируется не только контекстом. На ее проявление влияют также мутации рибосом, в том числе, и в “центре точности”. Например, замена C1054 на A в 16S вызывает супрессию UGA, но и отчасти других stop-кодонов.

Вообще, замены в т.наз. helix (биспиральном участке) 34 в 16S рРНК влияют на термацию и на сдвиг рамки считывания. Проскок терминатора зависит также от некоторых нуклеотидов в

23S РНК (например, от C726 и U2555 в 23S), а также от мутаций в белках: S4 (ramA мутаций), S5, S12, S17, L7/12.

Существует гипотеза о том, что когда-то многие кодоны были незанятыми и служили терминаторами, и лишь постепенно их количество уменьшалось по мере введения в оборот все новых аминокислот.

Используется ли терминация как регулятор экспрессии белка, помимо уже обсуждавшейся “вилки” — выбора дальнейшего хода событий после терминации? Вопрос дискутируется. Есть, например, намек на роль фосфорилирования eRF-факторов. В самое последнее время обнаружили в млекопитающих несколько генов белка, существенного для пролиферации клеток, их экспрессия изменяется при переходе от одной фазы развития клеток к другой. Эти белки по-разному экспрессируются в разных тканях. Но они сходны с eRF3 тем, что связываются с eRF1, связывают GTP и имеют аминокислотные аналогии с eRF1. Что это значит, покажет будущее.

Наконец, о других факторах, связанных с терминацией. Их наличие не исключено. И даже известен один из них. Это фактор рециклизации рибосом (“ribosome recycling factor”) RRF или RF4, присутствие которого освобождает рибосому от мРНК после терминации. Он жизненно необходим для клеток *E.coli* и действует совместно с EFG или с RF3 факторами и GTP. В отсутствие же фактора рибосома не освобождается, а продвигается по мРНК с участием EFG и GTP и начинает новую инициацию на той же мРНК на следующем кодоне.

8 мРНК

Несколько слов об мРНК вообще. Очевидно, что количество мРНК — это мощный регулятор экспрессии того или иного белка. С молчащих генов мРНК не синтезируется, с работающих — синтезируется с большой скоростью. Я не включил в свой план рассказ об этом синтезе. Это, как мне кажется, тема лекций о транскрипции. Но количество мРНК в клетке зависит также и от скорости распада мРНК. Она, в общем-то, должна быть, как правило, короткоживущей (относительно времени жизни клетки); только тогда возможно приспособление клетки к меняющимся условиям. Это ясно демонстрируется как функционально, если проследить за появлением и исчезновением индуцируемого фермента в ответ на индуктор (бета-галактозидазы в ответ на кратковременную подачу изопропилтиогалактозида ИПТГ, щелочной фосфатазы — на добавление неорганического фосфата), так и по физическому распаду (после кратковременной подачи меченого фосфата). Время жизни мРНК в бактериях в среднем 1–2 минуты при времени генерации 20 мин.—12 часов. Но это средние данные. На самом деле скорости распада разных мРНК очень сильно различаются, даже для мРНК с одного и того же цистрона (в *E. coli* — от 0,5 до 20 мин). Например, в ретикулоцитах, где 95 % синтезируемого белка — глобин, мРНК, вообще, стабильна в течение нескольких дней. Скорости распада регулируются специальными сигналами на мРНК, в частности, защитой копцов от экзонуклеаз. Например, 5'- и 3'-концы защищены иногда от экзонуклеаз шпилькой в нетранслируемых областях, а, может быть, и взаимодействием с какими-то ингибиторами; могут быть и наоборот, стимуляторы в виде шпилек. Расщепление 3'-конца мРНК в *E. coli*, по-видимому, стимулирует поли(А), которая к этому концу присоединена (7–20 нуклеотидов; у высших 50–200). Защита от эндонуклеаз может вводиться через изменение сродства мРНК к эндонуклеазам путем включения определенных первичных последовательностей в лидерные или трейлерные области мРНК, имеющих повышенное сродство к эндонуклеазам.

Даже механизмы распада могут быть, по-видимому, разными у разных мРНК. Это видно из того, что на распад по-разному влияют ингибиторы трансляции. В *E. coli* один из главных ферментов, предназначенных для разрушения мРНК — РНКаз Е (экспрессируется с гена *rne*). Влияет также РНКаз Р, предназначенная, в основном, для процессинга тРНК и так называемая РНКаз III. Эти нуклеазы существенны для жизнеспособности клеток. Но этого не скажешь о многих других рибонуклеазах, которых в *E. coli* более 20. Лишь 4 из них подозреваются в том, что они предназначены для разрушения мРНК. По крайней мере, часть РНКаз одновременно может отсутствовать, то есть, они в значительной мере взаимозаменяемы.

Но, вообще, механизмы распада мРНК и его регуляция еще недостаточно изучены.

9 ИНИЦИАЦИЯ

Инициация — наиболее сложный этап трансляции. Кроме рибосом в нем участвуют мРНК, инициаторная тРНК и так называемые белковые “факторы инициации” IF (у эукариот — eIF). Сложность и многоступенчатость процесса приводят к его относительной медленности; поэтому именно инициация определяет валовую скорость трансляции, и на этом этапе в значительной мере имеет место регулирование экспрессии. Механизмы инициации у эукариот, в принципе, те же, что у прокариот, но все же сильно от них отличаются. Отличия в значительной мере связаны с тем, что в прокариотах мРНК по мере транскрипции сразу же поступает в рибосомы и транслируется. В эукариотах же она сначала процессируется, затем транспортируется через ядерную мембрану в цитозоль и лишь после этого начинается трансляция.

9.1 ИНИЦИАТОРНЫЕ тРНК

В 1964 г. было установлено, что почти половина всех белков *E. coli* содержит на N-конце метионин (Waller). Вскоре было показано, что инициация всегда начинается со специальной метиониновой тРНК — тРНК^{Met} (у прокариот, хлоропластов и митохондрий) или тРНК^{Met}₁ (у эукариот). Для элонгации имеется другая метиониновая тРНК^{Met}₂, откликающаяся на тот же кодон AUG, который не только является инициаторным, но и кодирует метионин и в середине полипептидной цепи. Метионил-тРНК синтетаза (MTS) у обеих тРНК^{Met} одна и та же. В результате, после трансляции все белки имеют на N-конце метионин, причем у прокариот он формилирован. Затем белки процессируются: сначала пептидеформилаза (PDF) отщепляет формильную группу, а затем специальный фермент метиониламинопептидаза (MAP) отщепляет у части белков метионин. Вероятность отщепления метионина зависит от предконцевой аминокислоты. Наиболее легко отщепление идет перед Gly, Ala и Pro, и поэтому относительно много белков содержит эти аминокислоты в N-конце.

После аминоацилирования метионином тРНК^{Met} (у прокариот, хлоропластов и митохондрий) немедленно формилируется по аминогруппе метионина (Рис. 9.1):

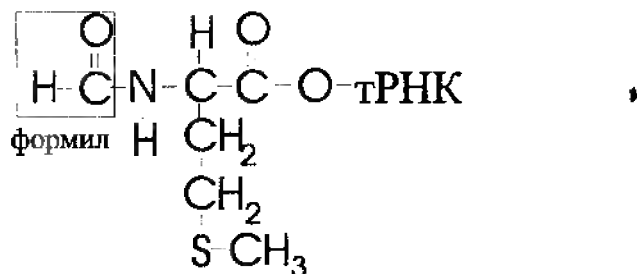


Рис. 9.1. Формилметионил-тРНК

с помощью специального фермента метионилформилтрансферазы (MFT), переносящей формильную группу HCO- с формилтетрагидрофолиевой кислоты (лейковорина). У эукариот такого формилирования тРНК^{Met}₁ нет.

Дальнейший ход инициации проходит с участием нескольких белковых факторов: трех — в прокариотах (IF1 IF3) и довольно большого числа — в эукариотах (eIF). Один из факторов,

IF2 (eIF2), еще до связывания с рибосомами образует “тройной комплекс” с инициаторной метионил-тРНК и GTP. Это как бы аналог фактора элонгации EFTu (eEF1(α)).

Аминоацилированные инициаторные тРНК, в отличие от элонгаторных, не могут взаимодействовать с бинарным элонгаторным комплексом EFTu.GTP (или с его аналогом у эукариот, eEF1(α).GTP), т. е. не образуют с ним тройной комплекс и не могут поэтому участвовать в элонгации. В свою очередь, IF2 (eIF2).GTP отличается от элонгаторного аналога. Но тройной комплекс IF2 с не-инициаторными аминоацил-тРНК все же может образоваться, хотя и хуже, чем с инициаторной (f)Met-тРНК.

В прокариотах комплекс IF2.GTP.fMet-тРНК^{fMet} с участием других факторов инициации и мРНК соединяется с 30S субчастицей рибосомы. Эта субчастица возникает при диссоциации полных 70S рибосом, освободившихся после очередного раунда синтеза. Диссоциация происходит под действием фактора IF3, который взаимодействует с 16S рРНК в составе рибосом и остается на 30S субчастицах, где его впервые и обнаружили. В образовании комплекса принимает также участие фактор IF1. IF1 — небольшой белок (180 аминокислот) — изолирован из солевого отмыва рибосом. Роль его менее ясна. Он не ослабляет ассоциацию субчастиц, но увеличивает скорость их диссоциации и помогает вытеснить из рибосом мРНК и тРНК перед инициацией. С участием этих факторов субчастица затем связывается с мРНК в участке, специально предназначенном для инициации.

9.2 УЧАСТКИ мРНК, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИЕ С РИБОСОМОЙ ПРИ ИНИЦИАЦИИ

Участок мРНК, связывающийся первоначально с рибосомой, защищен последней от РНКазы на длине около 30 нуклеотидов, что позволило выделить и сиквенировать десятки таких участков (RBS — ribosome binding sites). Они содержат инициаторный кодон. В прокариотах в 90 % случаев это AUG, в остальных GUG, UUG и, хотя и очень редко, AUA и AUU. В RBS содержатся также последовательности, имеющие специальное сродство к рибосоме. У прокариот они содержатся в участке от -20 до +13 (считая нулевым положение А в AUG), и даже дальше, до +26. Прежде всего, это полипуриновая последовательность Шайн-Дальгарно (SD, 1974), от -5 до -13, имеющая консенсус -UAAGGAGGU и сродство к рибосоме за счет комплементарности к 3'-концу 16S рРНК. Эта комплементарность имеет протяженность разную в разных мРНК, от 3 до 9 пар подряд, считая в числе них и G-U. Важно расстояние от SD до AUG; оно оптимально равно 5 нуклеотидам. Реально встречается от 3 до 12. Позиция -3 тоже важна — там предпочтителен А. Возможны и взаимодействия с рРНК не только в области SD. Отклонения от консенсуса очень существенно влияют на относительную скорость инициации. Тем не менее, очень странно, что некоторое небольшое количество мРНК не имеет SD вообще! Возможно, ее заменяют или дополняют другие взаимодействия с рибосомой. Например, последовательность downstream от AUG влияет на экспрессию некоторых генов за счет взаимодействия с 16S и с белками S1 и S21. В 16S это нуклеотиды 1469–1483, которые стимулируют инициацию как в мРНК с SD, так и без нее, и тем сильнее, чем точнее комплементарность ее к области downstream мРНК от +15 до +26. Сейчас такие участки находят у все большего числа мРНК, как фагов, так и *E. coli*.

Вторичная структура RBS оказывает преобладающее влияние на скорость инициации, и это используется, по-видимому, для регулирования последней.

Факторы IF1 и IF3 повышают скорость и специфичность связывания 30S с RBS и предотвращают неправильные взаимодействия. Отдельно от мРНК к 30S субчастице присоединяется также тройной инициаторный комплекс IF2.GTP.fMet-тРНК^{fMet}, имеющий сродство к ней даже и в отсутствие мРНК. Что из них присоединяется раньше — неизвестно. Затем к 30S-комплексу присоединяется 50S субчастица, IF1 и IF3 уходят. Наконец, уже с полной 70S рибосомы, уходит IF2 параллельно с расщеплением GTP до GDP, а инициаторная тРНК оказывается

в рибосоме в донорном состоянии — на Р сайте или, может быть, на специальном инициаторном сайте, тоже донорном. Предполагается, что такое размещение предопределяется как особым сродством fMet-тРНК^{fMet} к Р сайту, так и взаимодействием с IF3. Все эти события задают рамку считывания, после чего начинается уже обычная элонгация.

9.3 ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ ИНИЦИАТОРНЫХ тРНК

Инициаторные тРНК по своей первичной и вторичной структуре мало отличаются от обычных, элонгаторных тРНК^{Met}. И те и другие ацилируются одной и той же метионил-тРНК синтетазой (MTS). Генно-инженерные замены нуклеотидов в метиониновых тРНК *E.coli* показали, что детерминанты MTS у них обеих одинаковы. Хотя некоторое значение имеют A73 и пары G2-C71 и C3-G70, главные детерминанты MTS у обеих тРНК — это три нуклеотида антикодона C34, A35, U36. Последнее обстоятельство создало экспериментальные трудности при выявлении этих детерминантов.

Небольшое сравнительно отличия инициаторной тРНК все же достаточны для того, чтобы аппарат трансляции отличил ее от других тРНК и использовал именно для инициации. Из сказанного выше ясно, что необходимо, чтобы:

инициаторная Met-тРНК формилировалась MFT, а остальные аминоксил-тРНК (в том числе и Met-тРНК_M) — нет;

инициаторная Met-тРНК узнавалась IF2 (eIF2) но не узнавалась EFTu (eEF1(α)), а остальные аминоксил-тРНК — наоборот;

тройной комплекс IF2.GTP (eIF2.GTP) с инициаторной Met-тРНК узнавал 30S(40S) субчастицу в инициаторной форме (связанную с инициаторными факторами);

инициаторная Met-тРНК имела бы особое сродство к Р сайту, а другие аминоксил-тРНК — нет.

Сейчас об этом многое известно. Не останавливаясь на более ранних работах, скажу о современных исследованиях, наиболее доказательных, позволивших выявить некоторые важные специфические детерминанты инициаторных тРНК.

Одна из трудностей эксперимента состояла в том, что главные детерминанты аминокислотной специфичности метиониновых тРНК находятся в антикодоне. Поэтому нельзя сделать их супрессорными. Но рентген кристаллов MTS.Met-тРНК позволил определить контакты в этом комплексе и на этой основе аминокислотными заменами сконструировать мутанты MTS, аминокисляющие метиониновую тРНК с амбер-супрессорным антикодоном CUA. Оказалось, что для этого достаточно заменить одну из кислых аминокислот MTS (Asp449 или Asp456) на нейтральную в С-концевой области, непосредственно участвующей в связывании тРНК. Далее, использовали два штамма *E.coli*, несущие репортерный ген *lacZ* с амбер-кодоном TAG (UAG в РНК) либо в инициаторной, либо во внутренней позиции. В клетки вводили разные варианты клонированных генов супрессорной тРНК^{Met} (с антикодоном CUA вместо CAU). Кроме того, в клетках сверхпродуцировалась мутантная MTS, аминокисляющая метионином супрессорную тРНК, несмотря на ее измененный антикодон. Измерение супрессии, т. е. выхода галактозидазы, позволило определить роль той или иной метиониновой тРНК в элонгации или инициации.

Оказалось, что элонгаторная тРНК^{Met} супрессирует только при элонгации, в середине цепи, а инициаторная тРНК^{Met} — только при инициации, в начале цепи. Их роль взаимно изменяется, если взаимно заменить у них акцепторные и антикодоновые стебли одновременно. То есть именно в этих стеблях находятся соответствующие детерминанты.

При подробном рассмотрении оказалось, что важной особенностью инициаторной тРНК^{Met}, отличающей ее от элонгаторной, является наличие некомплементарной пары C1..A72 в акцепторном стебле. Эта особенность, а также еще несколько пар в акцепторном стебле и в D-стебле (G2-C71, C3-G70 и A11-C23), являются детерминантами трансформилазы. Неспаренность C1..A72

особенно важна. Этого нет ни в одной элонгаторной тРНК. Возможно, что для формилируемости необходимо плавление акценторного стебля на ферменте и некомплементарность это плавление облегчает. Детерминантом формилирования служит также и сам метионин, точнее, его боковая цепь $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SCH}_3$, однако, одного его недостаточно, иначе бы формилировался метионин в элонгаторной тРНК^{Met_M}.

Другая особенность: у инициаторной тРНК имеются три G.C пары подряд в антикодонном стебле. В результате взаимодействия с этими тремя парами, сама антикодонная петля тРНК приобретает специальную конформацию, не свойственную элонгаторным тРНК, что и заставляет ее взаимодействовать нужным образом в инициаторном комплексе с 30S субчастицей и связанным с ней IF3, так, чтобы в инициаторном комплексе оказаться не на А, а на Р (или на инициаторном) сайте.

В свою очередь, от формилирования (хотя и не только от него; существенен также A73) зависит способность fMet-тРНК^{fMet} связываться с IF2-фактором и не связываться с EFTu. Это свойство очень важно, поскольку эти факторы и обе метиониновые тРНК взаимно конкурируют в цитоплазме. тРНК^{fMet} в цитоплазме E.coli в 2 раза больше, чем тРНК^{Met_M}, а EFTu — во много раз больше, чем IF2.

Совершенно аналогично происходит инициация в органеллах эукариот — в митохондриях и хлоропластах. Эти органеллы имеют собственный “мили” геном, содержащий ряд необходимых для инициации генов, которых нет в главном геноме. Некоторые из них (например, ген MTF) по первичной структуре высоко гомологичны гену E.coli. Это один из главных аргументов в пользу происхождения этих органелл из бактерий-симбионтов.

Как известно, мРНК в прокариотах часто полицистронная, и возможны разные варианты инициации отдельных генов: от проскальзывания рибосомы (30S субчастицы) на последующий цистрон, до самостоятельной независимой инициации последнего. Отчасти это зависит от длины междистронной области, которая может иметь от >30 нуклеотидов до нуля, и даже до -1 (последний А терминирующего кодона является первым в AUG). Возможно и образование вторичных структур, закрывающих доступ к второму RBS, пока транслирующая рибосома не развернет его. Известно также, что рибосомы и про- и эукариот присоединяются к мРНК одна за другой по мере освобождения RBS, так что на мРНК движутся одновременно несколько рибосом, образуя “полисомы”, хорошо видимые в электронном микроскопе как “бусы” (см. Рис. 9.2).

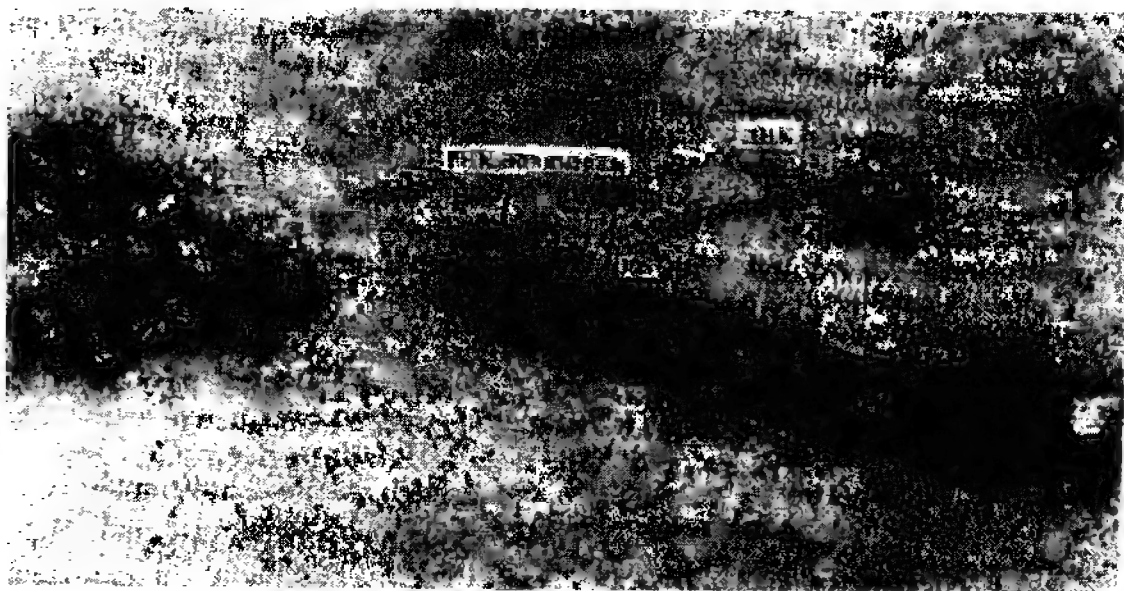


Рис. 9.2. Полирибосомы в электронном микроскопе

9.4 ИНИЦИАЦИЯ И ФАКТОРЫ ИНИЦИАЦИИ ЭУКАРИОТ

Инициация в эукариотах намного более сложна, чем у прокариот, но в последние годы ее изучение очень сильно продвинулось. Происходящие во время нее события аналогичны вышеописанным, но имеют много отличий. В ней также участвует специальная инициаторная тРНК^{Met} (чтобы отличить от элонгаторной, ее обозначают как тРНК^{Met}), но метионин в ее составе не формилируется. Она так же, как и при инициации в эукариотах, связывается с белковым фактором, eIF2, аналогом прокариотного IF2 (и элонгаторных EFTu и eIF1(α)) и GTP в тройной комплексе. Роль формила, как отрицательного детерминанта инициаторной Met-тРНК, предотвращающего ее связывание с фактором элонгации eEF1 α (аналогом EFTu), в эукариотах играют другие элементы, например, у дрожжей — посттранскрипционная модификация A64. В процессе участвуют больше 10 факторов инициации. Вероятно, это усложнение обусловлено необходимостью особенно тонкой регулировки эффективности трансляции. К настоящему времени сложилась некоторая картина, которая, несомненно, будет еще уточняться и корректироваться. Наконец, значительно различаются сигнальные элементы на мРНК (см. ниже).

Существенное отличие состоит также в том, что при инициации 40S субчастица связывается с RBS мРНК не за счет комплементарных взаимодействий рРНК с мРНК, но за счет РНК-белковых взаимодействий через eIF-факторы. Здесь также наблюдаются несколько стадий: освободившаяся после терминации 80S рибосома под действием eIF1A и eIF3 диссоциирует и факторы с 40S субчастицей образуют комплекс 43S. Независимо от этого, мРНК связывается с фактором eIF4F. Для этой цели на 5'-конце мРНК имеется сигнал - кэп, представляющий собой GTP, присоединенный своим g-фосфатом к 5'-ОН группе 5'-концевого нуклеотида мРНК и затем метилированный.

eIF3, как теперь установлено, есть сложный комплекс из не менее, чем 8 субъединиц, способный взаимодействовать с мРНК-ассоциированным eIF4F. Последний, в свою очередь, состоит из двух центральных субъединиц: eIF4E, взаимодействующей с кэпом мРНК, и большого белка eIF4G. Сейчас выяснено, что С-домен последнего ответственен за взаимодействие с eIF3, а N-домен — с eIF4E.

Уже на пути связывания eIF3 и eIF4G (т.е. мРНК с 40S субчастицей) реализуются некоторые возможности регулирования. Например, клетки экспрессируют ряд белков, обозначаемых 4E-BP, способных ингибировать образование eIF4F из eIF4E и eIF4G. В частности, один из таких белков, 4E-BP1, имеет в структуре мотив -Tyr.Asp.Arg - - Phe.Leu-, общий с eIF4G, и за счет него в нефосфорилированной форме связывается с IF4E, конкурируя с eIF4G. Этот путь, например, используют вирусы для подавления трансляции на собственных мРНК клеток, индуцируя дефосфорилирование 4E-BP. Наоборот, факторы роста вызывают фосфорилирование этих белков, увеличивая скорость инициации на соответствующих мРНК.

Тройной комплекс Met-tRNA, eIF2.GTP связывается с 43S независимо от мРНК. Затем все это образование связывается с мРНК у 5'-конца последней за счет только что описанных взаимодействий и скользит по ней до первого кодона AUG, который и является в эукариотах инициаторным. Гены эукариот моноцистронны, и вопрос об инициации с AUG в середине мРНК в общем случае не встает. При этом разнообразные функции выполняют факторы инициации eIF4E, eIF4G, eIF4A, eIF4B. В частности, они помогают расплавить вторичную структуру мРНК с участием макроэрга АТФ. Когда поиск завершен, вступает в действие новый фактор, eIF5. Молекула GTP распадается до GDP, факторы eIF2.GDP и eIF3 уходят, притом GDP в первом из них под действием фактора eIF2B снова заменяется на GTP (похоже на элонгацию!).

Теперь к инициаторному комплексу присоединяется 60S субчастица. Образовавшийся 80S комплекс готов к элонгации.

Схема взаимодействия компонентов инициаторного комплекса в эукариотах приведена для иллюстрации на Рис.9.3.

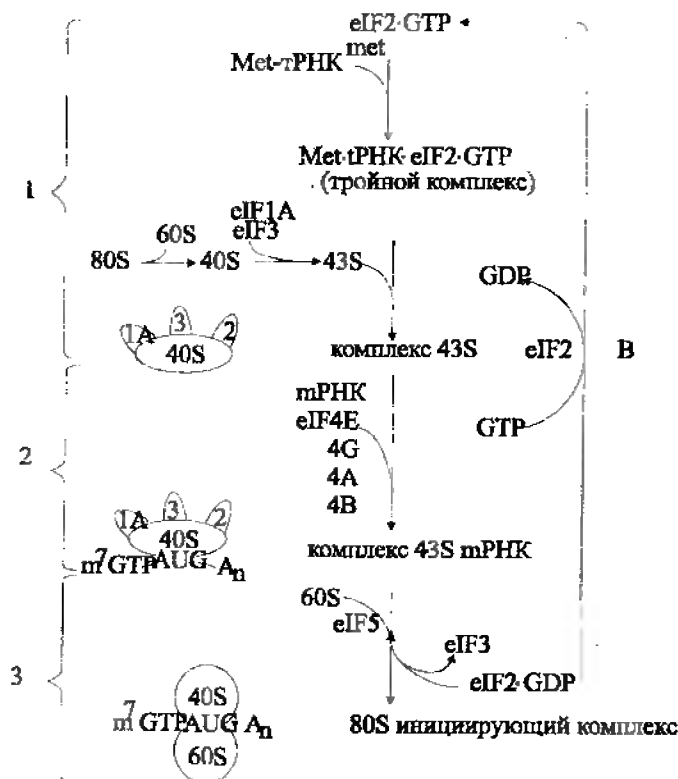


Рис. 9.3 Схема взаимодействий компонентов инициаторного комплекса в эукариотах.

Эта картина упрощенная. Существуют, по-видимому, альтернативные пути связывания RBS с комплексом 43S. Например, пикорнавирусы имеют лидерный участок мРНК длиной 650–1300 нуклеотидов, и в нем - несколько “ложных” AUG, так что инициация волей-неволей не может начаться с 5'-конца. Но РНК этих вирусов, тем не менее, имеет преимущество перед собственной мРНК клетки. Более подробно - см., например, обзор Sachs et al. (1997).

Последние годы ознаменовались подробнейшим изучением множества инициаторных факторов, их первичной и четвертичной структуры. Некоторые из них клонированы, и даже сделан рентгеноструктурный анализ. Удалось проследить структурные “мотивы”, включая домены связывания тех или иных лигандов. Рассказывать об этом подробно едва ли здесь уместно (см., например, обзоры Pain (1996) и Brown & Schreiber (1996)).

10 лет назад установили, что инициация в эукариотах происходит в подавляющем большинстве случаев на 1-м AUG от начала мРНК. Главным сигналом служит экспонирование 5'-конца мРНК, т.е. посадка на него m⁷G. 95% мРНК позвоночных и почти все мРНК вирусов начинаются с кэпа. Кроме того, сигналом служит первичная структура вокруг инициаторного AUG. Статистический анализ (699!) разных мРНК позвоночных и систематический мутагенез показал, что наиболее благоприятна первичная структура – GCCGCCGCCAUGG –, по крайней мере, у позвоночных. Хотя возможны и отклонения от идеальной первичной структуры, снижающие вероятность трансляции с данной мРНК. Наиболее сильно влияют N(-3) и G(+4). Замены их изменяют вероятность инициации в 10 и более раз. (Здесь за +1 принят A в AUG). “Плохие” контексты используются для ограничения синтеза некоторых белков, перепроизводство которых нежелательно (например, гормона роста). Правда, в дрожжах эффект контекста оказался сравнительно слабым.

Известно также, что нечитаемая 5'-область мРНК склонна к образованию вторичных структур (шпилек). Инициаторные факторы помогают разместить в комплексе 5'-конец мРНК (eIF4E), расплавить мешающую посадке и сканированию структуру мРНК (eIF4A и eIF4B), обеспечить достаточно сильное взаимодействие рибосомного комплекса с мРНК (вероятно,

eIF4G). В результате, сканированию после посадки комплекса на мРНК эукариот обычно шпильчатые структуры не мешают, в отличие от прокариот.

Сложная система инициации позволяет регулировать трансляцию отдельных белков в широком диапазоне относительных и абсолютных скоростей под влиянием самых разных сигналов. Роль факторов выяснена в системах *in vitro* и *in vivo* (мутанты). Фактор eIF4A расплавляет вторичную структуру мРНК за счет энергии АТФ и даже по своей первичной структуре имеет сходство с ДНК-хеликазой. eIF4В ускоряет этот процесс и имеет в своем составе “мотив РНК-связывающего сайта”. Все факторы исследованы на предмет жизненной необходимости для клетки. Но пока неясна детально последовательность всех частных взаимодействий.

Последовательность downstream от -AUGG-, в эукариотах влияет на инициацию также путем образования прилегающей шпильки, которая может и тормозить и стимулировать инициацию с AUG.

Известны также многие случаи инициации не с AUG, а с CUG, ACG, UUG и даже с UAG, хотя почти всегда с меньшей эффективностью. Правда, как исключение, *in vitro* в дрожжах инициация с GUG идет даже с большей эффективностью, чем с AUG. Это, по-видимому, тоже некий способ регулирования. Для такой инициации в дрожжах основания в антикодоне инициаторной тРНК специальным образом модифицированы, так что эта тРНК оказывается способной с некоторой вероятностью узнавать квазиинициаторный кодон. Естественно, последний должен быть включен в благоприятный контекст. Если контекст менее благоприятен, то специфичность инициации по отношению к AUG выражена сильнее.

Как ни удивительно, 3'-нетранслируемые участки мРНК тоже выполняют регуляторную роль, не всегда понятным пока способом. Например, регуляторную роль в них могут играть A+U — богатые области (иногда повторы) и полиА-концы. Предполагается, что какие-то белковые факторы связываются с поли(А), а затем взаимодействуют с eIF4G, мРНК изгибается в кольцо, и это как-то помогает комплексу eIF-факторов с 40S разместиться на 5'-конце мРНК.

Таким образом, складывается следующая картина. Инициация идет с помощью тРНК_i, имеющей антикодон 5'-CAU-3'. При этом в эукариотах мРНК всегда сначала взаимодействует с рибосомой (точнее, с ее 40S субчастицей) своим 5'-концом за счет кэпа. Далее, рибосома скользит до первого инициаторного кодона и останавливается, узнав специальную первичную структуру, а затем уже тРНК_i, заранее присоединившаяся к малой субчастице, своим антикодоном взаимодействует с мРНК. Далее присоединяется большая субчастица. Взаимодействия в таком комплексе обеспечивают расположение инициаторной тРНК на Р сайте рибосомы. Далее, образуется первая пептидная связь, а затем идет дальнейшая элонгация. В процессе инициации на разных ее этапах участвует большое количество eIF факторов, роль которых большей частью пока окончательно не выяснена.

Замечательно интересной особенностью некоторых мРНК эукариот является, как теперь известно, то, что инициация может быть и не на первом инициаторном кодоне. Различают случаи альтернативной инициации, наличие нескольких open reading frames (ORF) на одной мРНК, и внутреннюю инициацию.

Например, бывает, что часть рибосом распознает первый AUG, но, иногда соскальзывает и ко второму (leaky scanning), или даже к третьему. Это может случиться, если первый AUG находится в не очень благоприятном окружении, или слишком близко к кэпу, и первый цистрон мал (“миницистрон”). Бывает также, что первым инициаторным кодоном служит CUG, ACG или GUG, но тогда они находятся, наоборот, в относительно выгодном контексте. Это явление обнаружено в нескольких десятках случаев и имеет регуляторное значение. Например, если оба AUG, и первый, и второй, находятся в одной рамке считывания, и между ними нет терминирующего кодона, синтезируется более длинный и более короткий белки в определенном соотношении, имеющие даже специальное назначение. Если первый AUG миницистрона находится out of frame, иногда синтезируются два разных белка. Если первый AUG стоит в хорошем

контексте, и между первым и вторым AUG находится терминирующий кодон in frame, последующая аутентичная инициация может быть сильно замедлена и разными способами отрегулирована. И система синтезирует короткие полипептиды. Это доказали красивые эксперименты на искусственных мРНК. Можно искусственно ввести перед геном дополнительный инициаторный кодон, и тогда инициация будет происходить на нем. Но если между искусственным и естественным инициаторными кодонами ввести терминаторный кодон, то правильная трансляция восстановится. Это будет как бы двухцистронная матрица с искусственным “миницистроном”. Очевидно, что рибосома не соскакивает сразу с мРНК после терминации. По мере увеличения расстояния между терминатором и последующим AUG, вероятность инициации с последнего уменьшается, т.е. рибосома на некоторой длине соскакивает. Миницистроны найдены в нескольких реальных случаях, где служат, вероятно, регуляторами.

Пикорнавирусная мРНК (rhino- entero- cardio-viruses, гепатит А) — одно из исключений, когда инициация происходит на внутреннем AUG мРНК. Их мРНК не копируется, имеет длинную нечитаемую 5'-область и ряд особенностей. Данные о механизме этой специфической инициации даны, например, в обзорах [Pain (1996) и Brown & Schreiber (1996)]. Оказывается, существуют специальные IRES (internal ribosome entry site) участки, прилегающие к внутреннему AUG, которые взаимодействуют с eIF4F и затем в иницировании участвуют почти все те же eIF, что и при иницировании с 5'-конца.

Все описанные механизмы позволяют обеспечить инициацию именно на том кодоне, на котором необходимо. Ведь инициаторные кодоны составляют всего 20 % от всех кодонов AUG в геноме.

Считается, что инициация — это одна из важнейших стадий регуляции экспрессии, где регулируется и “глобальная” и дифференциальная скорость синтеза. Этот тип регуляции, по-видимому, очень важен для процессов дифференцировки клеток. Один из путей регулирования — возможность фосфорилирования некоторых факторов инициации. Некоторые из факторов — вообще фосфопротеины. Регулирование такого рода через eIF2 и eIF4E доказано. Найдены и исследованы соответствующие фосфокиназы. В качестве примера исследована регуляторная цепь, предотвращающая синтез белка (глобина) в эритроидных клетках, в которых не хватает гема. Так называемый гем-контролируемый репрессор (HCR) — белок 70 кДа — фосфорилирует Ser51 у фактора eIF2, если последний не связан с гемом. Другой пример — защита от вирусной инфекции, осуществляемая через киназу PKR (Protein Kinase activated by double-stranded RNA). Последняя активируется интерферонами, выделяемыми соседними клетками. При последующей вирусной инфекции киназа подавляет инициацию, фосфорилируя опять-таки eIF2. Есть также данные относительно прямого (не опосредованного фосфорилированием) влияния инсулина и фактора роста на синтез белков за счет усиления инициации трансляции.

Особенно интересна возможность трансляционного регулирования при раннем эмбриогенезе, в отсутствие транскрипции. В яйцеклетках после оплодотворения и на ранних стадиях эмбриогенеза увеличивается количество работающих рибосом (в форме полисом) и мобилизуются мРНК из ранее нетранслируемого пула. В значительной мере это происходит за счет депрессирования инициации, а также и диссоциации белков-репрессоров от мРНК при фосфорилировании-дефосфорилировании.

Начинает также изучаться последовательная активация трансляции отдельных мРНК по мере развития организма. Этот вопрос очень сложен и здесь я о нем говорить не буду. Стоит упомянуть о глубокой корреляции удлинения поли(А)-хвоста мРНК (от сотни до двух сотен нуклеотидов) с ходом эмбриогенеза. А те мРНК, которые надо отключить, теряют поли(А). Эти процессы управляются как-то через посредство специальных регуляторных участков (ADE — adenylation control elements or CPE — cytoplasmic control elements), расположенных в 3'-нетранслируемой области мРНК и включающих U-богатый участок, и ниже него — AAUAAA. Были найдены и некоторые специальные белки, взаимодействующие с этими элементами. Как влияет затем

уже сама поли(А) на 3'-конце мРНК - пока не вполне ясно. Возможно, поли(А) взаимодействует с 5'-нетранслируемой областью и даже с кэпом, организуя мРНК в кольцо (см. выше).

Таким образом, мы можем утверждать, что инициация, особенно у эукариот, открывает широкие возможности регулирования экспрессии генов уже после транскрипции, на стадии трансляции. Ясно, что в этой области предстоит открыть еще очень многое.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж.* Молекулярная биология клетки, 1е изд. Мир, М, 1986, или 2е изд., 1994.
2. *Шанвиль Ф., Энни А.* -Л. Биосинтез белка, Мир, М., 1977
3. *Lewin B.* Genes, Oxford University Press, Oxford, 1994 (*Льюин Б.* Гены, М., Мир, 1987)
4. *Sachs A.B., Sarnov P., Hentze M.W.* Starting at the beginning, middle and end: translation initiation in eukaryotes *Cell* 89(6), 831–838 (1997)
5. *Pain V.M.* Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells *Eur.J.Biochem.* 236, 747–771 (1996)
6. *Brown E.J., Schreiber S.L.* A signaling pathway to translational control *Cell* 86, 517–520 (1996)
7. *Stansfield I., Jones K.M., Tuite M.F.* The end in sight: terminating translation in eukaryotes *TIBS* 20, 489–491 (1995)
8. *Nakamura K.I., Isaksson L.A.* Emerging understanding of translation termination *Cell* 87, 147–150 (1996)
9. *Schmitt E., Guillon J.M., Meinnel T., Mechulam Y., Dardel F., Blanguet S.* Molecular recognition governing the initiation of translation in *Escherichia coli* *Biochimie* 78(7), 543–554 (1996)

10 НЕОДНОЗНАЧНОСТЬ ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОДА

10.1 ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

В первые годы после расшифровки генетического кода поражала воображение его универсальность. Он был одинаков всюду — от бактерии до человека: “что верно для *Escherichia coli*, то верно и для слона”... Ф. Крик дал даже этому обоснование: стабильность кода обусловлена тем, что любое изменение чревато катастрофой для организма. Но постепенно накапливались сведения об отклонениях — как в значении отдельных кодонов, так и в правилах линейного их прочтения. Некоторые авторы называют всю совокупность таких отклонений “перекодированием” (“recoding”), относя к ним трансляцию с нестандартным прочтением кодонов (в том числе и использование стоп-кодонов как элонгаторных) (“redefinition”), коррекцию кодонов на мРНК (“editing”), заданный сдвиг рамки в определенном месте при считывании (“frameshifting”), а также и перепрыгивание рибосомы во время трансляции через несколько кодонов на мРНК (шунтирование, “bypassing”). Можно отнести к этим явлениям и так называемую “транс-трансляцию”.

Первые опыты 1973–1978 гг. показали примеры нестандартности кодирования у фагов и вирусов: один из белков фага Q β требовал для синтеза прочтения UGA (opal) как Trp (UGG) (с эффективностью 3–5 %). Некоторые белки растительных вирусов также используют “бессмысленные” кодоны UAG и UGA как значащие. Для синтеза некоторых белков фагов T7 и MS2 требуется сдвиг рамки считывания. Затем примеры умножились. Нашли, что эти явления встречаются у очень важных белков и не только у вирусов. Например, сдвиг рамки у RF2 (release factor 2) *E. coli* и использование UGA для кодирования селеноцистеина, которое управляется специальным сигналом на мРНК (середина 80-х гг.).

Случаи перекодирования выявляются часто при сравнении сиквенированного гена с первичной структурой транслируемого белка. Во всех случаях явление перекодирования — динамическое, т. е. имеет место конкуренция со стандартной трансляцией. Я уже упоминал, что различают три основных класса: сдвиг рамки, изменения значения кодона и шунтирование.

10.2 ИЗМЕНЕНИЕ ЗНАЧЕНИЯ КОДОНА

В эукариотах, а позднее и в бактериях, найдено значительное количество отклонений в генетическом коде. Сначала их обнаружили в митохондриях не растительных организмов, а затем — в ядрах клеток некоторых дрожжей, бактериях, простейших, в водорослях. Кодирование 21-й аминокислоты селеноцистеина на кодоне UGA (обычно это стоп-кодон) наблюдалось в белках позвоночных и бактерий. Ниже об этом я скажу. Вот, например, краткая таблица из учебника Lewin B. (1994), стр. 218 и из статьи Osawa S. *Proc. Roy. Soc.* 241, 19–28 (1990) (Таблица 1).

Естественно предполагать, что в организме должны появиться тРНК с соответствующими антикодонами. На самом деле, реализуются различные возможности, и неоднозначность основана на прочтении терминирующего кодона либо одной из естественных тРНК организма путем “нестандартного” кодон-антикодонного узнавания (напр., за счет модификации некоторых ее нуклеотидов), с помощью тРНК со специальным антикодоном, или изменения специфичности тРНК по отношению к аминоацил-тРНК-синтетазе. Примеры даны в Таблицах 2.

Примеры нестандартного использования кодонов некоторыми организмами

Организм	Кодон	Значение кодона	Станд. значение
МИТОХОНДРИИ			
MTX, кроме растений	UGA	Trp	opal
млекопитающие	AG(A,G)	Stop	Arg
беспозвоночные		Ser	Arg
млекопитающие	AUA	Met(ini)	Ile
дрозофила	AUA	Met(ini)	Ile
дрожжи	AUA	Met(elon)	Ile
дрожжи	CUA	Thr	Leu
дрожжи	CUN	Thr	Leu
Некот. иглокожие	AAA	Asn	Lys
дрозофила	AGA	Ser	Arg
КЛЕТКИ			
Ацетобулярия	UAR	Glu	ochre и amber
Candida (грибки)	CUG	Ser	Leu
Mico- и piroplasma (бактерии)	UGA	Thr	opal

Таблица 2.

Изменения в клетках, приводящие к нестандартному прочтению кодонов

№	Кодон	Изменен на	Организм	За счет чего
1	UGA Stop	Trp	Микоплазма (ядра) и MTX (кроме растений)	Антикодон тРНК ^{Trp} CCA превр. в UCA и она стала супрессорной
2	AUA Ile	Met	MTX дрожжей и многокл. кроме иглокожих	тРНК ^{Met} (CAU) спаривается не только с AUG, но и с AUA (за счет модификации антикодона узнает не один, а два кодона и кроме Ile узнается Met)
	Met	Ile	MTX иглокожих	Обратное изм., антикодон GAU тРНК ^{Ile} читает вместо AU(CU) еще и AUA
3	AGR Arg	Ser	MTX многоклеточных кроме позвоночных	тРНК ^{Ser} (GCU) читает не только AGY, но и AGN из-за модификаций вблизи антикодона и тРНК читает и Arg и Ser кодоны
4	CUN Leu	Thr	MTX дрожжей	тРНК ^{Leu} (UAG) аминоацилируется треонином

Очевидно, что wobble-правила соответствия антикодонов тРНК кодонам мРНК должны быть расширены так, чтобы они распространялись на случаи, когда нуклеотиды самого антикодона и прилегающие к нему различным образом модифицированы. Интересен случай в строке 2 табл. 2, где видно, что в ходе эволюции произошло обращение кодового значения: кодон AUA снова стал читаться как Ile.

Оказалось, что все случаи нестандартности возникли как вторичные, на относительно поздних этапах эволюции, все управляются специальными сигналами на мРНК и являются основой некоторых механизмов регуляции. Это следует из многих наблюдений, в частности, из того, что у некоторых организмов наблюдается “recoding” того или иного типа, а у их близких родственников — нет, хотя эволюционно они разошлись не так давно. Например, у некоторых видов *Candida* recoding есть, а у других — нет.

Как могло безболезненно произойти изменение кода в ходе эволюции? Гипотетически, это может иметь место за счет вырожденности кода, когда один из нескольких кодонов аминокислоты становится минорным и постепенно совсем перестает использоваться и теряется. Тогда организм может его использовать для кодирования другой аминокислоты. Недаром особенно часто читаются nonsense-кодоны как значащие: UGA — как Trp, Cys, Sec, UAG — как Gln и Tyr, UAA — как Gln. Правда, бывает и наоборот: AGA в митохондриях быка и человека, AGG в митохондриях человека, CGG — в *Mycoplasma* используются как терминирующие.

“Перекодирование” — явление не такое уж редкое. Тем не менее, код, в основном, сохранился в течение миллиардов лет. Теперь приходится объяснять, почему код так стабилен? Пока признанного объяснения нет. Можно считать, что существующий в настоящее время код в чем-то похож на грамматику, где смысл некоторых слов зависит от контекста.

Иногда в эукариотах некоторые тРНК так модифицированы в антикодоне, что, кроме своего кодона, узнают одновременно с небольшой вероятностью также и один из терминирующих кодонов, т. е. имеет место как бы естественная супрессия. Наличие естественной супрессорной тРНК доказывается обычно введением ее в клетку в сильно увеличенном количестве (с мультикопийной плазмиды). Тогда супрессию легко наблюдать на введенных специально в те или иные гены нонсенс мутациях.

Такое явление оказалось естественным регулятором синтеза некоторых пар белков. Например, некоторые вирусы прочитывают кодоны UAG или UAA (amber и ochre) и таким образом синтезируют удлинненные белки (с вероятностью 10–20 %). В TMV (Вирусе Табачной Мозаики) проскальзывание через кодон UAG (amber) происходит с помощью специальной тРНК^{Tyr} (антикодон GYG, нормально прочитывающий кодоны Tyr UAY). Оно приводит к синтезу белка 183 кДа дополнительно к основному 126 кДа. В данном случае антикодон тРНК 5'-GYG спаривается с кодоном, имеющим G в wobble позиции, что нормально запрещено.

Как оказалось, и таких случаев немало. Например, многие вирусы растений читают UGA (opal) с 10 % эффективностью, которая определяется нуклеотидом C справа от кодона. Но бывают и более сложные регуляторные последовательности. У упомянутого случая с TMV регулятором является последовательность CAR YYA с 3'-стороны от amber UAG. Этот участок прочитывается в 5 % случаев и изменение количества естественной супрессорной тРНК на эту долю не влияет. Причина неясна, может быть, эта последовательность взаимодействует с 16S рРНК.

Некоторые инфузории (ciliate), в т. ч. *Tetrahymena* и *Paramecium*, используют amber UAG в качестве терминатора, но одновременно и его, и ochre UAA — как кодоны глутамина. В результате, *in vitro* в гетерологической системе с мРНК этих организмов считываются только короткие пептиды из-за частой терминации. Но в самой парамеции есть три специальные глутаминовые тРНК, и две из них оказываются супрессорами. Аналогичное прочтение нонсенс кодона как глутамина имеет место у некоторых эукариотных водорослей (algae — ацетобулярия, хламидомонада). Жизнеспособность такого организма определяется тем, что вероятность терминации на терминирующем кодоне зависит от контекста, и супрессорная тРНК даже при

значительной концентрации не слишком эффективно конкурирует с RF-факторами на специальном терминаторе и не является поэтому летальным фактором для клеток. Мы уже видели, что контекстным регулятором могут служить не только нуклеотид справа от стоп-кодона, но и более сложные структуры.

У ретровируса мышиного лейкоза Молони (Moloney Murine Leukose Virus, MMLV) локусы белков gag-pol (структурный белок оболочки — полимеразы) разделены терминатором UAG который разграничивает две рамки считывания (сдвига здесь не требуется). Этот кодон прочитывается в 5 % случаев и вместо него вставляется Gln (кодон CAG). Это важно почему-то для образования вириона. Заменить его можно любым другим стоп-кодоном, но не значащим кодоном. Оказалось, что для механизма важен псевдоузел (pseudoknot) ниже в мРНК. Псевдоузел — это шпилька, петля которой спарена с нижележащим участком РНК. (Рис. 7.1). Такие псевдоузлы играют роль и при программированной супрессии, и при программированном сдвиге рамки. Но не только они! Например, между узлом и кодоном при супрессии-терминации есть критические нуклеотиды, замена которых существенна. И механизм их влияния тоже был до сих пор непонятен.

Имеют также значение и элементы структуры самого псевдоузла. Например, сдвиг рамки в MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus) тоже задается псевдоузелом, но эти псевдоузлы в MMTV и MMLV взаимно заменить нельзя. Но полностью вопрос пока не был выяснен.

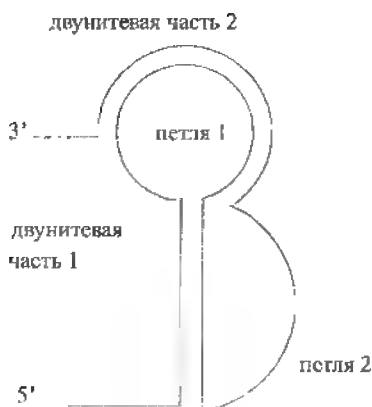


Рис. 7.1 Псевдоузел

10.2.1 СЕЛЕНОЦИСТЕИН

Отдельный интересный пример прочтения стоп-кодона UGA — включение на нем селеноцистеина. Селен похож на серу, и иногда Se входит в состав белка, заменяя серу, в форме SeMet или SeCys. В первом случае такие замены случайны. Но SeCys имеет более низкий редокс-потенциал, что иногда используют некоторые ферменты в каталитических центрах, куда он включается специфически (глицинредуктаза, форматдегидрогеназа *H. coli*, глутатион-пероксидаза мыши). Таких белков, правда, очень немного. У *E. coli* их всего три, и все форматдегидрогеназы (переносят протон на НАД с муравьиной кислоты, с выделением CO_2), у *Clostridium* (бактерия) — глицинредуктаза, у млекопитающих — пока известна дюжина (несколько глутатионпероксидаз, три иодтирониндеиодиназы и т.д.). У *E. coli* есть 4 специальных гена: Sel(A),(B),(C),(D). В форматдегидрогеназе Sec кодируется UGA (opal), который читает особая тРНК, экспрессируемая с гена Sel(C). Ее антикодон -UCA-, и она ацилируется серином, хотя и очень отличается от нормальной сериновой тРНК. Продуктами генов Sel(A) и Sel(D) Ser превращается в SelCys [$\text{NH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{SeH})\text{COOH}$, сокращенно Sec], уже находясь в связи с тРНК. Сходный механизм и у эукариотной глутатионпероксидазы. Таким образом, в обиход введена 21-я аминокислота. Мало того, для нее с гена Sel(B) синтезируется специальный аналог EFТ α -фактора — так называемый SELB-фактор (68 kDa). Хотя в млекопитающих аналогичный фактор не был еще найден (на 1996 г.), вероятно, и в этом случае он есть.

Во всех случаях кодон UGA одновременно в тех же организмах работает и как терминирующий. Какая структура на мРНК определяет его как терминатор, или как кодон для Sec? Показано, что специальная шпилька длиной 40 нуклеотидов непосредственно примыкает к кодону с 3'-стороны. Предполагается, что у бактерий тройной комплекс SELB.Sec-tRNA.GTP связывается с петлей этой шпильки, тем самым концентрируясь у А-сайта. Для этого у SELB имеется, по-видимому, специальный домен в С-конце, содержащем положительно заряженные аминокислоты, которого нет у EFTu-фактора. Одновременно, последний не способен связывать Sec tRNA, а SELB — связывать все аминоацил-тРНК, кроме Sec-tRNA. Специальный детерминант этого — лишняя (8-я) пара нуклеотидов в акцепторном стебле этой тРНК.

Правильно вставленная в мРНК шпилька стимулирует кодирование Sec любым UGA. Мало того, эта шпилька стимулирует включение Sec многими другими кодонами, если в селеноцистеиновой тРНК соответствующим образом заменить антикодон. У млекопитающих найдена другая система, где стимулирующий элемент находится не рядом с UGA, а в 3'-нетранслируемой области мРНК.

10.3 КВАЗИ-НЕОДНОЗНАЧНОСТЬ

Очень интересно также явление, которое можно назвать “квази-неоднозначностью” кода. В митохондриях растений найдено было несколько белков, аминокислотный состав которых не вполне соответствовал кодовой последовательности соответствующих генов. Но соответствовал составу мРНК. У грибов (fungi) — *Candida rugosa* — было найдено расхождение между первичной структурой гена липазы и самого белка по лейцину и серину. Оказалось, что кодон UCG кодирует Leu(кодон UUG) вместо Ser. Выяснили, что в этих случаях имеет место “редактирование” мРНК после транскрипции. Причем редактирование почти всегда заключается в заменах С на U. Как это происходит (например, м.б. быть, дезаминированием?) пока было не известно. Таких изменений было найдено около полутора десятков:

Thr – Ile (ACN – AUN); Arg – Trp (CGG – UGG); Ser – Leu (UCN – UUR); Ser – Phe (UCN – UUY); Pro – Ser, Leu, Phe (CCN – UCN, CUN, UUY); His – Tyr (CAY – UAY); Arg – Cys (CGY – UGY); Thr – Ile, Met (ACN – AUN)

10.4 СДВИГ РАМКИ СЧИТЫВАНИЯ

Сложный механизм иницирования обеспечивает задание правильной рамки считывания (“reading frame”). Но в некоторых, и даже не очень редких, случаях имеет место наперед заданный сдвиг рамки в середине текста. Он происходит в специальных местах матрицы, где текст устроен соответствующим образом. Вначале такие случаи наблюдались почти исключительно в ретровирусной мРНК (вирус саркомы Роуса (RSV), HIV, вирус лейкемии Т-клеток (HTCL)). Но позднее их обнаружили и в других организмах, даже и в *E. coli*, причем есть случаи как +1, так и –1 (но не +2 и –2).

Например, у HIV и RSV сдвиг вызывает экспрессию полимеразы (pol) как fused protein — белка, соединенного с выше расположенным продуктом гена gag (белок вируса) с эффективностью 10–15 %. Место сдвига на RSV - 5'-A₃U₃A -3', у HIV - 5'-U₆A -3'. Было такое наблюдение и у *E. coli* (γ-субъединица ДНК-полимеразы III). Оказалось также, что на вероятность сдвига рамки часто влияет довольно удаленный downstream контекст (бывает даже 80 нуклеотидов). В наблюдавшихся случаях оказалось, что имеется палиндром с образованием мРНК шпильки, прилегающей к месту возможного сдвига.

Генно-инженерными методами создают искусственные изменения в матрице и, таким образом, получается модель, на которой явление можно изучать. Сейчас любимая модель — фактор RF2 в *E. coli*. В его гене на 26-м месте стоит стоп, а для осмысленной дальнейшей трансляции

необходим сдвиг +1, что и происходит реально в 30 % случаев. Остальные 70 % дают короткий обрывок в 25 аминокислот. Место сдвига устроено так, что пептидил-тРНК, находящаяся на Р-сайте рибосомы, может соскользнуть на один нуклеотид вперед и при этом сохранится достаточно сильное кодон-антикодоновое взаимодействие. Антикодон тРНК^{Leu} GAG спаривается с CUU в "нулевой" рамке, а затем — с UUU в новой, +1, рамке на матрице -CUU UGA-C., вводя один Leu на 4 нуклеотида в мРНК. Затем идет Asp (кодон GAC). Напомню, что в РНК, в отличие от ДНК, квази-комплементарная пара G.U встречается достаточно часто. В данном случае возникает интересная обратная связь: синтезированный продукт перекодирования, RF2, сам способствует терминации, т. е. ослаблению перекодирования. Если его мало, терминация ослабляется, а сдвиг, т.е. выход RF2 увеличивается.

Одним из сигналов, ослабляющих терминацию в этом случае, служит С справа от UGA. Кроме того, оказалось, что одним из сигналов перекодирования служит последовательность с 5'-стороны от места сдвига, которая взаимодействует на рибосоме с 16S рРНК, подобно Шайн-Дальгарно при инициировании (Рис. 7.2):

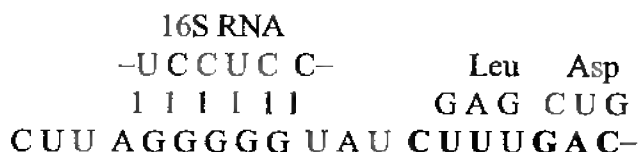


Рис. 7.2. Механизм сдвига рамки считывания при трансляции белка RF2

Она спаривается с участком 3'-UCCUCC-5' в 16S. Так что у RF2 имеются две SD-последовательности. Интересно, что у эволюционно далекой (грам-положительной) *B. subtilis* имеется такой же механизм. Как он действует — неясно. М.б. просто возникает задержка, помогающая как-то сдвигу.

Пример в хромосоме млекопитающих был на 1995–1996 гг. только один — при трансляции "антизима" орнитин-декарбоксилазы (ODC) — ключевого энзима синтеза полиаминов (у крыс, у человека, а также и лягушки). Здесь, кстати, тоже имеется авторегулировка, поскольку сдвиг рамки в данном случае (и только в нем) сам зависит от концентрации полиаминов. Антизим связывается с ODC и направляет его на деградацию. Здесь тоже имеется перекрытие рамок считывания, место которых было точно установлено при трансляции *in vitro* в системе из ретикулоцитов путем анализа белковых продуктов и сравнения с первичной структурой мРНК, различным образом мутированной. Место сдвига — -UCC-UGA-C-, притом не за счет перемещения антикодона тРНК^{Ser} с UCC на CCU, а за счет запираания антикодоном этой тРНК нуклеотида U терминатора UGA, в результате чего вместо терминации подключается аспарагил-тРНК с антикодоном GUC. Как происходит это запираание — пока неясно, но дело не в особенностях тРНК^{Ser}, поскольку ее можно заменить другой тРНК при соответствующем изменении кодонов. Чтобы процесс шел заметно, необходим псевдоузел, начинающийся через 3 нуклеотида с 3'-стороны (Рис. 7.3):

Еще интересный пример — транспонируемые элементы дрожжей Ty1 и Ty3. В элемент Ty3 входят гены *gag3* и *pol3*. *gag3* кодирует белок вирусоподобной частицы, а *pol3* — необходимый для транспозиции фермент. Начало последнего перекрывает 38 нуклеотидов в конце первого, но в рамке +1. 11 % рибосом преодолевают преграду и транслируют второй ген, который отдельного "входа" не имеет. Сдвиг происходит на участке GCG AGU U, который прочитывается не как аланин-серин, а как аланин-валин: GCG A GUU. Кодон в нулевой рамке, AGU, редкий сериновый, и, как обычно, нехватка соответствующей тРНК приводит к задержке на этом кодоне, и тем облегчает сдвиг, который стимулируется последовательностью 12 нуклеотидов с 3'-стороны, пока не известно, как. Как и в случае антизима, удалось показать, что реального соскальзывания в Р-сайте не происходит, а просто тРНК на нем не позволяет почему-то нуклеотиду А экспонироваться на А-сайте и сесть туда сериновой тРНК. В результате А пропускается (Рис. 7.4):

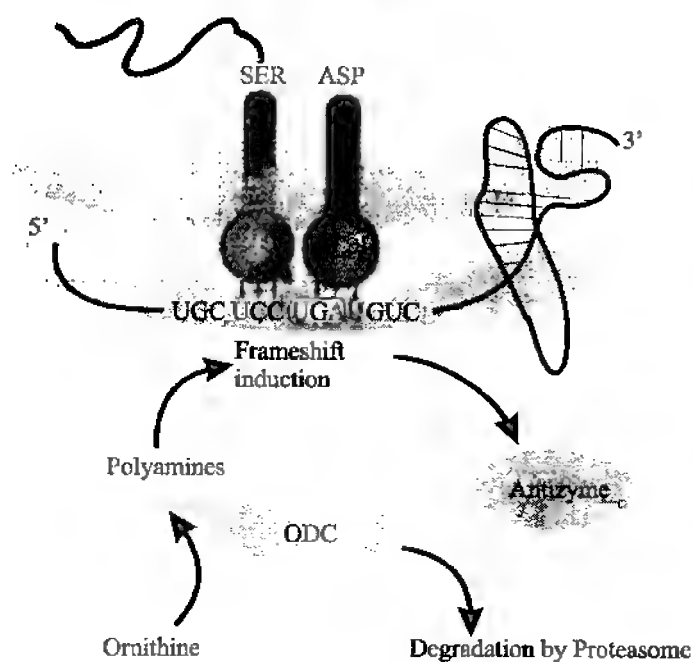


Рис. 7.3 Механизм сдвига рамки считывания при трансляции ODC

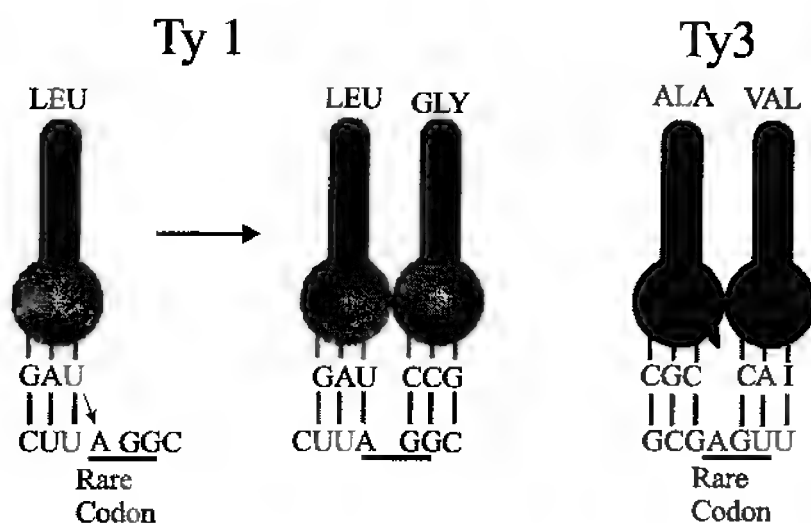


Рис. 7.4 . Механизм сдвига рамки считывания в дрожжевых транспонируемых элементах Ty дрожжей.

Между прочим, опыты показывают (см. также дополнительный материал в конце лекции), что взаимодействие антикодона тРНК с кодоном на Р сайте необходимо для обеспечения правильной рамки считывания. Сдвиги наблюдаются как двух- так и однокодонные, т. е. сдвигается по мРНК в одних случаях только антикодон пептидил-тРНК на Р сайте, а в других — антикодоны тРНК на обоих сайтах, А и Р. Но, вообще-то, это явление довольно сложное, не до конца еще понятое, и вероятность сдвига каким-то образом зависит иногда от модификации основания в антикодоне тРНК на А сайте.

Можно предполагать, что сдвиги рамок могут иметь место и как результат случайных ошибок там, где контекст мРНК более благоприятен. Анализ банка ДНК показал, что настоящие места с возможным сдвигом встречаются очень редко. Сдвиг, естественно, удастся обнаружить *in vivo* только там, где он приводит к изменениям фенотипа.

10.5 “ШУНТИРОВАНИЕ” ПРИ ТРАНСЛЯЦИИ

Есть примеры, когда в мРНК не удален небольшой интрон и рибосома при трансляции проскальзывает через него. Ген 60 фага Т4 кодирует субъединицу топоизомеразы мРНК кодирует 46 кодонов (последний — глициновый, GGA), после чего следует стоп-кодон UAG и еще 47 нуклеотидов (всего 50, не делится на 3), которые рибосома проскакивает, затем продолжает трансляцию на следующем за этим участком глициновом кодоне. Но на этих обрамляющих интрон кодонах включается только один глицин. Затем трансляция продолжается до конца с большой эффективностью (Рис. 7.5). До этого наблюдали несколько случаев шунтирования более короткого и менее эффективного. Необходимым условием служит повторение кодона перед и после пропуска, притом на них обоих кодируется только одна аминокислота, т.е. пептидил-тРНК соскакивает с предлежащего кодона и скользит до следующего специфического (например, GCU(Ala) или GGA(Gly)), и на них включается только одна аминокислота. Для проскока в гене 60, как кажется, необходима определенная последовательность из 16 аминокислот в растущей цепи (от 17-го до 32-го), основных и гидрофобных. В начале проскока этот участок находится еще внутри рибосомы (которая вмещает около 30 аминокислот растущей цепи). Гипотеза состоит в том, что определенная пептидная структура способна проскальзывать сквозь “выходной канал” рибосомы, который давно уже постулировался и как будто бы виден на электронно-микроскопических фотографиях. Мутационный анализ показал, что в bypassing вовлечен рибосомный белок L9. Всего описаны, но не так подробно, еще 3–4 случая. Интересно не только само явление, но и ограничительные механизмы, не дающие ему происходить часто. Значение этого феномена неизвестно. Не исключено, впрочем, и другое объяснение, предполагающее образование пепти на мРНК, включающей шунтируемый участок и переход трансляции прямо через место замыкания петли.

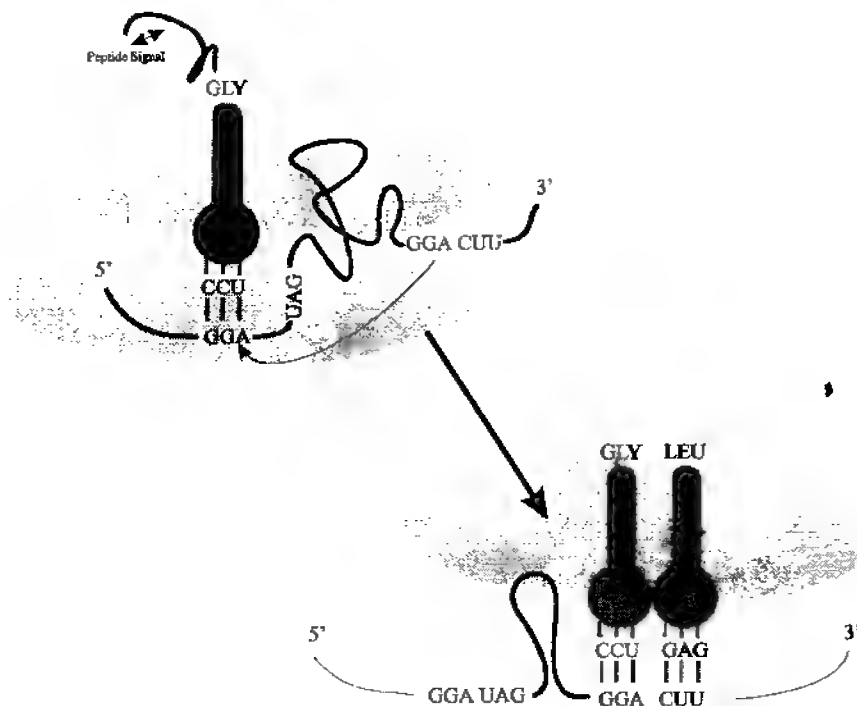


Рис. 7.5 Механизм “шунтирования” участка мРНК.

10.6 “ТРАНС-ТРАНСЛЯЦИЯ”

Еще один интересный случай, который можно отнести к классу “перекодирования” – это так называемая “транс-трансляция”. Когда трансляция идет на мРНК, у которой оторван 3'-конец со стоп-кодоном, нормальная термминация все-таки происходит, но полипептид получается на 11 аминокислот длиннее, чем предписывает “оборванная” мРНК. Найдена специальная 10Sa РНК, которая аминоацилируется аланином и кодирует в своей первичной структуре еще 10 аминокислот и стоп-кодон. Эта аланил-РНК располагается на А сайте, как аминоацил-тРНК, аланин присоединяется к растущей полипептидной цепи, после чего синтез продолжается на 10Sa РНК, как на матрице, и присоединяется еще 10 аминокислот (Рис. 7.6). Перескок с матрицы на матрицу и дал основания для принятого названия. Думают, что этот механизм обеспечивает освобождение рибосом от испорченной нуклеазами мРНК с оторванным терминирующим кодоном, а 11-мер на С-конец образовавшегося белка обеспечивает отправку его на уничтожение.

Помимо всего прочего, нестандартная трансляция предлагает нам модели для изучения самых тонких механизмов трансляции.

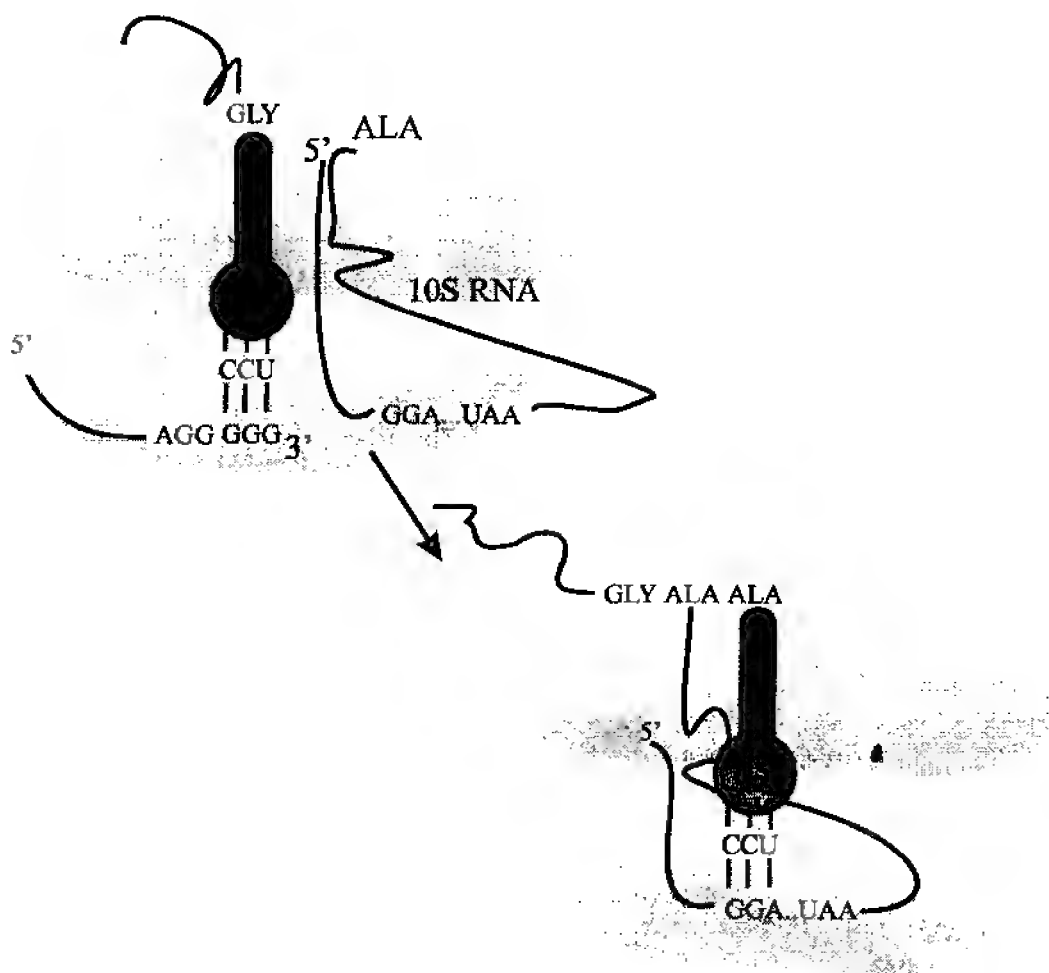


Рис. 7.6. “Транс-трансляция”

11 ПРОЦЕССИНГ И ТРАНСПОРТИРОВКА БЕЛКОВ

Процессинг белков, т. е. посттрансляционное преобразование, довольно сложен и разнообразен. Здесь я упомяну только несколько общих для всех белков моментов.

О создании вторичной и третичной структур мы уже говорили. Предполагается, что первичная структура автоматически задает вторичную и третичную. Механизм, помогающий этому процессу — взаимодействие белков (и РНК) с катализаторами укладки — шаперонами. Таких катализаторов открыто уже несколько, и они действуют посредством образования обратимого комплекса с субстратным белком в ходе многократных актов ассоциации - диссоциации. О том, как работают шапероны, см., например, Lorimer G. et al. *Nature* 388(№ 6644) 720–723 (1997), где дана пространственная структура комплексов по рентгеноструктурным данным.

Мы говорили также и об отщеплении формильной группы и метионина с N-конца полипептида. Но с белками происходит и множество других изменений уже после трансляции: фосфорилирование, гликозилирование, присоединение липидов, отщепление участков на N- и C-концах и т.д. В наш курс эти вопросы не включены. Упомяну только о том, что для транспорта через мембраны (например, через оболочку ядра и клеточных органелл) белки имеют специальную последовательность, обычно на N-конце, но иногда и на C-конце, которая отличает эти белки от нетранспортируемых аналогов. Если транспортируемый и нетранспортируемый аналоги экспрессируются с одного гена, лидерная последовательность белка кодируется нуклеотидной последовательностью, расположенной выше нормального белкового стартового кодона, и тоже начинающейся с AUG. Хотя аминокислотная последовательность транспортных “надставок” не стандартна, они отличаются (для митохондрий) тем, что содержат несколько неионизирующихся аминокислот и основные аминокислоты, но не содержат кислых.

12 ВНЕРИБОСОМНЫЙ СИНТЕЗ ПОЛИПЕПТИДОВ

Таких пептидов много, и часто их отличают наличие необычных аминокислот (в т. ч. правых) и нестандартных связей между ними. Это глутатион, токсины (гепатотоксин некоторых цианобактерий) и антибиотики (грамидин S) и т.д. Они синтезируются без мРНК, без участия рибосом, но иногда с частичным участием элементов аппарата трансляции например, аминокислоты могут предварительно образовывать аденилаты). Направляют эти синтезы специальные ферментные системы (см., например, Шапвиль и Энни (1977) стр. 264).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Lewin B.* Genes, Oxford University Press, Oxford, 1994 (Льюин Б. Гены, М., Мир, 1987)
2. *Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж.* Молекулярная биология клетки 1е изд. Мир М, 1986, или 2е изд., 1994.
3. *Jukes T.M., Osawa S.* The genetic code in mitochondria and chloroplasts *Experientia* 46(11), 1117 (1990)
4. *Gesteland R.F., Atkins J.F.* RECODING: dynamic reprogramming of translation. *Annu.Rev.Biochem.* 65, 741–768 (1996)
5. *Gesteland R.F., Weiss R.F., Atkins J.F.* Recoding: programmed genetic decoding *Science* 257, 1640–1641 (1992)
6. *Stadtman T.C.* Selenocysteine *Annu.Rev.Biochem.* 65, 83–100 (1995)
7. *Hatfield D., Oroszlan S.* The where, what and how of ribosomal frameshifting in retroviral protein synthesis *TIBS* 15, 186–190 (1990)
8. *Шапвиль Ф., Энни А.* -Л. Биосинтез белка, Мир, М., 1977

Дополнительный материал к разделу “Сдвиг рамки”:

Аналогичное явление наблюдается и в *Ty1*: сдвиг +1 на участке –CUU A GGC– (см. Рис. 7.4) дает нужный белок. Как и в *Ty3*, не используемый кодон аргинина AGG — редкий, но в этом случае реальное скольжение есть.

Примеры сдвига –1 также нередки. В геноме вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV) гены *gag* (структурный белок), *pro* (протеаза вируса) и *pol* (обратная транскриптаза и интеграз) устроены с перекрытием так, что 23 % случаев дает со сдвигом –1 белок *gag-pro*, а 8 % со вторым сдвигом –1 дает *gag-pro-pol*. Особенностью в данном случае является то, что скольжение происходит относительно обеих тРНК, в А и Р сайтах одновременно, на последовательностях типа X XXY YYZ (так наз. “тандемный сдвиг”). Стимулирует этот сдвиг псевдоузел ниже по ходу мРНК.

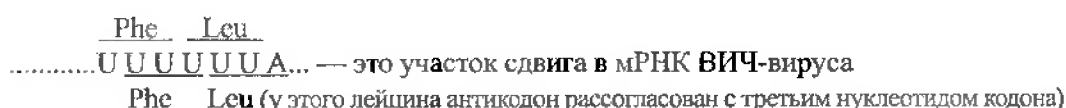
В Вирусе Инфекционного Бронхита при сдвиге –1 показана необходимость псевдоузла ниже по ходу мРНК. В MMTV тоже важна такая структура, расположенная в нескольких нуклеотидах от места сдвига ниже по ходу. Может быть, их роль — также в приостановке трансляции на месте сдвига. Хотя можно заменами создать структуру мРНК, которая приостанавливает трансляцию, не стимулируя сдвига. В ВИЧ вирусе очень склонное к сдвигу место U UUU UUA стимулируется простой маленькой шпилькой.

Ген *dnaX* *E.coli* экспрессирует субъединицы τ и γ ДНК-полимеразы III. Только τ (молекулярная масса 71 кДа) жизненно необходима. Она синтезируется в стандартной рамке, но сдвиг –1, не доходя 1/3 до конца, дает в 50 % случаев терминацию и белок γ 47 кДа. Тандемный сдвиг происходит на A AAA AAG. Сигналы — SD слева, которая спаривается с 16S (стимулирует вероятность сдвига вдвое), и шпилька

справа (стимулирует в 10 раз). SD, как видим, может способствовать инициации, а также давать сдвиг и “-” и “+”. Оптимальные расстояния от места действия при этом разные (5, 10–13 и 3, соответственно).

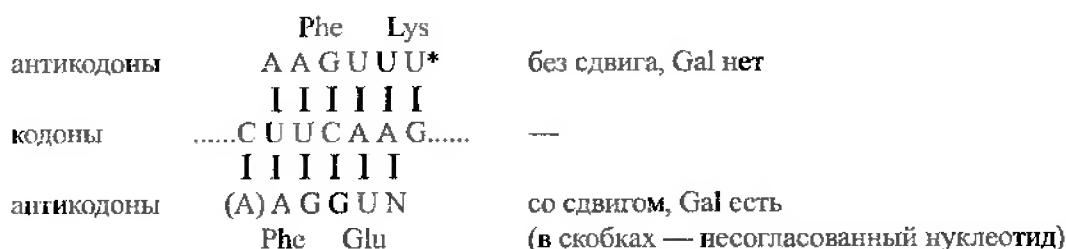
При попытках объяснить молекулярный механизм явления оказалось, что спонтанному сдвигу всегда соответствует возможность одновременного соскальзывания двух соседних антикодонов. В результате вместо триплета на рибосоме прочитывается дублет, или тетраплет.

Например:

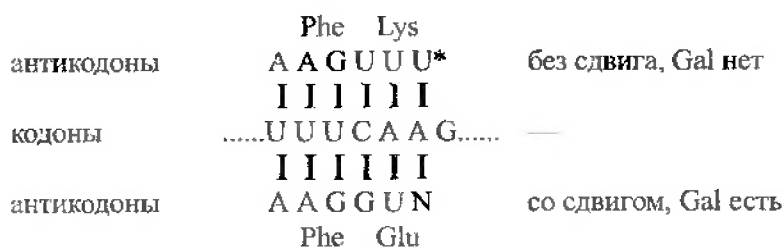


Джонатан Галлант (Вашингтонский университет, Сиэтл) нашел, что при определенном контексте возможны подобные сдвиги, провоцируемые отсутствием соответствующей тРНК. В *E. coli*, в плазмиду был введен ген галактозидазы под *gal*-промотором. В начало гена был введен участок, допускающий проскальзывание влево так, что после проскальзывания антикодоны обеих тРНК продолжают взаимодействовать с кодонами матрицы. Ген был модифицирован так, что правильная рамка считывания была только при сдвиге трансляции

на -1. мРНК выглядела так:



или:



Если лишить систему Lys-тРНК, то с заметно большей вероятностью происходит сдвиг рамки. Последовательность аминокислот получается нормальной слева от изображенного места, а справа - соответствует сдвигу на -1, и начинается с Glu, что подтверждено аминокислотным сиквенсом. Реально это было сделано таким образом, что сдвиг рамки приводил к синтезу активной β-галактозидазы на плазмиде.

Самое важное здесь — показано, что вероятность сдвига возрастала не менее, чем на порядок величины, если после сдвига все три нуклеотида кодона и антикодона на Р сайте спарены, по сравнению с тем случаем, когда один из них неспарен. Это возрастание происходило и в случае сильного, и умеренного голодания по лизину.

И правда, в такой конструкции неизвестно, ушла ли пептидил-тРНК с Р сайта до сдвига. или после него, или во время сдвига.

СОДЕРЖАНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ И ИСТОРИЯ	3
1.1 Структура белка	3
1.2 Трансляция	6
1.3 Расшифровка генетического кода	8
1.4 Аппарат трансляции	11
1.4.1 Приготовление и стабильность рибосом, бесклеточная система	12
2. РИБОСОМЫ	14
2.1 Состав и структура рибосомы	14
2.2 Разборка и сборка рибосом	18
2.3 Рибосомные белки	18
2.3.1 Экспрессия рибосомных белков в клетках	20
2.4 Рибосомная РНК	22
2.4.1 Гены рРНК и их регулирование	22
2.4.2 Процессинг рРНК	23
2.4.3 Посттранскрипционная модификация нуклеозидов в рРНК	24
2.4.4 Структура рибосомной рРНК	24
2.5 Влияние мутаций рРНК на функции рибосом	27
2.6 Филогенетические соотношения на основе рРНК	28
3. МИТОХОНДРИИ	30
3.1 Рибосомы митохондрий	30
3.2 рРНК митохондрий	30
3.3 Рибосомные белки митохондрий	31
4. ТРАНСПОРТНАЯ РНК И РЕАКЦИЯ АМИНОАЦИЛИРОВАНИЯ	32
4.1 Общие сведения о структуре тРНК	32
4.2 Экспрессия в клетках и процессинг тРНК	34
4.3 Аминоацил-тРНК синтетазы	35
5. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ тРНК С АМИНОАЦИЛ-тРНК СИНТЕТАЗАМИ	37
5.1 Взаимодействие биологических молекул общие принципы	37
5.2 Селективность взаимодействия	40
5.3 Узнавание аминокислот аминоксил-тРНК синтетазой	41
5.4 Узнавание тРНК аминоксил-тРНК синтетазой	43
5.4.1 Экспериментальное определение детерминантов аминоксил-тРНК синтетазы на молекуле тРНК	44
5.4.2 Супрессия. Аминокислотная специфичность тРНК при супрессии	44
5.4.3 Эксперименты 1974–1986 г.г.	45
5.4.4 Аланиновая тРНК	47
5.4.5 MinI и MinG шпильки	47
5.4.6 У некоторых тРНК детерминантов много	49
6. ЭЛОНГАЦИЯ	51
6.1 Общие сведения об элонгации	51
6.2 Селекция и транспептидация	53
6.3 Транслокация	56
6.4 Скорость элонгации	59

6.5 Антибиотики	59
6.6 Энергетика элонгации	60
6.7 Элонгация у эукариот	60
7 ТЕРМИНАЦИЯ	62
7.1 Терминация и супрессия. Терминация рибосомами	63
8. мРНК	65
9. ИНИЦИАЦИЯ	66
9.1 Инициаторные тРНК	66
9.2 Участки мРНК, взаимодействующие с рибосомой при инициации	67
9.3 Особенности структуры инициаторных тРНК	68
9.4 Инициация и факторы инициации эукариот	70
10. НЕОДНОЗНАЧНОСТЬ ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОДА	75
10.1 Общие сведения	75
10.2 Изменение значения кодона	75
10.3 Квази-неоднозначность	79
10.4 Сдвиг рамки считывания	79
10.5 “Шунтирование” при трансляции	82
10.6 “Транс-Трансляция”	83
11 ПРОЦЕССИНГ И ТРАНСПОРТИРОВКА БЕЛКОВ	84
12 ВНЕРИБОСОМНЫЙ СИНТЕЗ ПОЛИПЕПТИДОВ	85
Дополнительный материал к разделу “Сдвиг рамки”	85

САМИНСКИЙ Евгений Матвеевич

ТРАНСЛЯЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОДА НА РИБОСОМАХ

Компьютерная верстка *Н.А. Романычевой*

Директор Издательства СПбГТУ *А.В. Иванов*

Лицензия ЛР№ 020593 от 07.08.97

Подписано в печать 13.12.2000. Формат 60×84/8.

Печать офсетная. Усл. псч. л. 11,0. Уч.-изд. л. 11,0. Тираж 200. Заказ 705.

Отпечатано с готового оригинал-макета, предоставленного автором, в Издательстве СПбГТУ.

Адрес университета и издательства:
195251, Санкт-Петербург, Политехническая, 29.